

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 10 月 13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/094866 A1(51) 国際特許分類: A61K 38/00, 48/00, A61P 3/00, 3/10,
9/00, C12N 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006357

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 31 日 (31.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
60/557,708 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004) US(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式
会社 東京大学 TLO (TODAI TLO, LTD.) [JP/JP];
〒1130033 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo(JP). 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI
PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038405 東京
都中央区日本橋本町二丁目 2 番 6 号 Tokyo (JP). 日
産化学工業株式会社 (NISSAN CHEMICAL INDUS-
TRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1010054 東京都千代田区神田
錦町 3-7-1 興和一橋ビル Tokyo (JP).

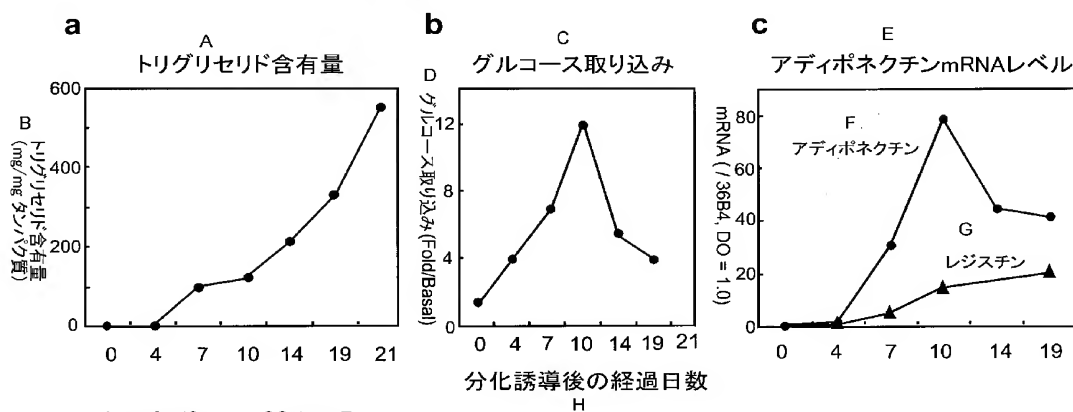
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 門脇 孝 (KAD-
OWAKI, Takashi) [JP/JP]; 〒1130034 東京都文京区湯
島 4-8-8-203 Tokyo (JP). 山内 敏正 (YA-
MAUCHI, Toshimasa) [JP/JP]; 〒1130024 東京都文京
区西片 2-17-3 Tokyo (JP). 北嶋 晶子 (KITA-
JIMA, Shoko) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本
橋本町二丁目 2 番 6 号 三菱ウェルファーマ株式会
社内 Tokyo (JP). 伊藤 祐介 (ITO, Yusuke) [JP/JP]; 〒

[続葉有]

(54) Title: ADIPONECTIN EXPRESSION INDUCER AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: アディポネクチン発現誘導剤およびその利用



A TRIGLYCERIDE CONTENT
B TRIGLYCERIDE CONTENT (mg/mg PROTEIN)
C GLUCOSE INTAKE
D GLUCOSE INTAKE (Fold/Basal)
E ADIPONECTIN mRNA LEVEL
F ADIPONECTIN mRNA (36B4, DO = 1.0)
G RESISTIN
H TIME (DAYS) AFTER INDUCTION OF DIFFERENTIATION

(57) Abstract: It is intended to provide an adiponectin expression inducer, a remedy for obesity and diseases relating thereto, for example, cardiovascular diseases or metabolic diseases by using the same, and a method of searching for an adiponectin expression inducer. It is indicated that KLF9, which is capable of binding to a 32 bp fragment of from -188- to -157-positions starting with the expression initiator of adiponectin, can enhance the adiponectin promoter activity. Therefore, it is suggested that KLF9 supplemental therapy with the use of KLF9 as an adiponectin expression inducer might contribute to the prevention and treatment for obesity or diseases relating thereto, for example, metabolic diseases such as insulin resistance diabetes and type 2 diabetes and cardiovascular diseases.

(57) 要約: 本発明は、アディポネクチン発現誘導剤およびこれを用いた肥満症およびこれに関連する疾患、例えば、心血管疾患または代謝性疾患の治療薬を提供し、および、アディポネクチン発現誘導剤の探索方法を提供するアディポネクチン発現の開始点から-188位から-157位までの32bpフラグメントに結合し得

[続葉有]

WO 2005/094866 A1



3490294 埼玉県南埼玉郡白岡町大字白岡 1 4 7 0 日
産化学工業株式会社 生物科学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国のための先の出願に基づく優先権を
主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))
- すべての指定国のための先の出願に基づく優先権を
主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))
- すべての指定国のための先の出願に基づく優先権を
主張する出願人の資格に関する申立て(規則4.17(iii))

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

るKLF9がアディポネクチンプロモータ活性を増強させることが示された。従って、本発明は、KLF9を用いてア
ディポネクチン発現誘導剤として利用し、KLF9の補足療法が肥満症またはこれに関連する疾患、例えば、インス
リン抵抗性及び2型糖尿病などの代謝性疾患や心血管疾患の予防・治療に役立つことが示唆される。

明 細 書

アディポネクチン発現誘導剤およびその利用

技術分野

- [0001] 本発明はアディポネクチン発現誘導剤に関して、特にKLF9を介してアディポネクチンの発現を誘導し得る薬剤およびこれを応用した代謝性疾患または心疾患の予防・治療用医薬品に関する。さらには、本発明はアディポネクチンの発現を誘導し得る物質およびこれを応用した代謝性疾患または心疾患の予防・治療用薬剤のスクリーニング方法およびこれに用いる細胞に関する。

背景技術

- [0002] 肥満症は、脂肪組織の量の増加として定義され、糖尿病、高脂質血症及び冠動脈心疾患のような心血管性及び代謝性障害を発症する危険性が高い(非特許文献1、2)。しかし、肥満症とこれら疾患との関連性を説明し得る分子機構は解明されていない。脂肪組織自体は、変化するエネルギー要求に応じて、トリグリセリド(TG)貯蔵及び遊離脂肪酸(FFA)／グリセロール放出を行う組織として機能する(非特許文献1)。また脂肪組織は、FFA(非特許文献3)、アジプシン(非特許文献4)、腫瘍壊死因子 α (非特許文献5)、レプチン(非特許文献6)、プラスミノゲン活性化因子阻害因子1(非特許文献7)及びレジスチン(非特許文献8)などの「アディポカイン」と呼ばれる数多くの生物学的活性物質を分泌する重要な内分泌器官でもあり、様々な種類のエネルギー恒常性調節を行っている。
- [0003] アディポネクチン又はAcrp30(非特許文献9－12)は、複数の生物学的機能を有する脂肪組織由来のホルモンである。肥満症、インスリン抵抗性及び2型糖尿病では、血漿アディポネクチンレベルが低下する(非特許文献13)。アディポネクチンの投与は、血中グルコース濃度を低下させ、インスリン抵抗性が改善されることをマウスを用いた実験から確認されている(非特許文献14－16)。逆にマウスでアディポネクチンを欠損させると、インスリン抵抗性及び糖尿病の病態が表れることも報告されている(非特許文献17、18)。
- [0004] アディポネクチンによるインスリン感受性誘導活性は、PPAR α 活性化を通じ(非特

許文献19、20)、また急性的にはAMPキナーゼを通じて(非特許文献21、22)、脂肪酸酸化の増大により誘導されると予想されている。内皮細胞(Human aortic endothelial cells: HAEC)及びマクロファージでは、抗炎症効果のような抗アテローム特性を有する可能性がある(非特許文献23、24)。アポE欠損マウスにおいてアディポネクチンを高発現させると、炎症に関与する分子の発現が低下し、これに付随してアテローム性動脈硬化症の改善が示された(非特許文献19、25)。アディポネクチン欠損マウスでは、新たな脈管内膜の形成増大が見られた(非特許文献17、26)。

[0005] 最近、アディポネクチンレセプター(AdipoR) 1、2をコードしているcDNAがクローニングされたことが報告されている(非特許文献27、特許文献1)。AdipoR1は、骨格筋で豊富に発現されるのに対して、AdipoR2は、主として肝臓で発現される。AdipoR1及びR2は、7個所の貫膜通ドメインを含むが(非特許文献27)、Gタンパク質結合レセプターとは構造的にも機能的にも区別できる(非特許文献28-30)と予測されている。AdipoR1及びR2は、球状(globular)及び全長アディポネクチンに対するレセプターとして働き、AMPK(非特許文献21、22)、PPAR α リガンド活性化(非特許文献19、20)及びアディポネクチンによる脂肪酸酸化やグルコース摂取(非特許文献27)の増大を誘導する。

特許文献1:WO2004/061108

非特許文献1:Spiegelman, B.M. & Flier, J.S., Cell 87, 377-389 (1996).

非特許文献2:Friedman, J.M., Nature 404, 632-634 (2000).

非特許文献3:White, R.T. et al., J. Biol. Chem. 267, 9210-9213 (1992).

非特許文献4:Hotamisligil, G.S. et.al., Science 259, 87-91, (1993).

非特許文献5:Zhang, Y. et al., Nature 372, 425-432, (1994).

非特許文献6:Shulman, G.I., J. Clin. Invest. 106, 171-176 (2000).

非特許文献7:Shimomura, I. et al., Nat. Med. 2, 800-803 (1996).

非特許文献8:Steppan, C.M. et al., Nature 409, 307-312 (2001).

非特許文献9:Scherer, P.E. et al., J. Biol. Chem. 270, 26746-26749 (1995).

非特許文献10:Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B.M., J. Biol. Chem. 271, 10697-10703 (1996).

非特許文献11:Maeda, K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 286-296 (1996).

非特許文献12:Nakano, Y., et al., J. Biochem. (Tokyo) 120, 802-812 (1996).

非特許文献13:Hotta, K. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 1595-1599, 2000.

非特許文献14:Fruebis, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 2005-2010 (2001).

非特許文献15:Yamauchi, T. et al., Nat. Med. 7, 941-946 (2001).

非特許文献16:Berg, A.H. et al., Nat. Med. 7, 947-953 (2001).

非特許文献17:Kubota, N. et al., J. Biol. Chem. 277, 25863-25866 (2002).

非特許文献18:Maeda, N. et al., Nat. Med. 8, 731-737 (2002).

非特許文献19:Kersten, S. et al., Nature 405, 421-424 (2000).

非特許文献20:Yamauchi, T. et al., J. Biol. Chem. 278, 2461-2468 (2003).

非特許文献21:Yamauchi, T. et al., Nat. Med. 8, 1288-1295 (2002).

非特許文献22:Tomas, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99, 16309-16313 (2002).

非特許文献23:Ouchi, N. et al., Circulation 103, 1057-1063 (2001).

非特許文献24:Yokota, T. et al., Blood 96, 1723-1732 (2000).

非特許文献25:Okamoto, Y. et al., Circulation 106, 2767-2770 (2002).

非特許文献26:Matsuda, M. et al., J. Biol. Chem. 277, 37487-37491 (2002).

非特許文献27:Yamauchi, T. et al., Nature 423, 762-769 (2003).

非特許文献28:Wess, J., FASEB. J. 11, 346-354 (1997).

非特許文献29:Yokomizo, T. et al., Nature 387, 620-624 (1997).

非特許文献30:Scheer, A. et al., EMBO. J. 15, 3566-3578 (1996).

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 肥満症で見られるアディポネクチン産生の低下は、インスリン抵抗性、糖尿病、心血管疾患のような肥満症関連疾患の発症を決定付ける要因と考えられている。し

かし、その根底にある分子的決定因子は、未だに解明されていない。そこで、本発明は、第一に、脂肪細胞肥大に依存したアディポネクチン産生抑制の作用機作を解明すること、第二に、アディポネクチン遺伝子の発現を上昇させ得る因子を解明すること、第三にアディポネクチン発現誘導剤およびこれを用いた肥満症およびこれに関連する疾患、例えば、心血管疾患または代謝性疾患の治療薬を提供すること、第四に、アディポネクチン発現誘導剤の探索方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 上述の通り、アディポネクチン／Acrp30は脂肪細胞より分泌されるホルモンであり、抗糖尿病性及び抗アテローム性アディポカインとして作用する。アディポネクチン／Acrp30の転写は、肥満症の脂肪組織で低下し、この低下は肥満症におけるインスリン抵抗性への発展に関与する。本発明者らは、アディポネクチン遺伝子の転写制御を担うメカニズム解明のために、アディポネクチン遺伝子のプロモータ領域の位置を特定するための肥大脂肪細胞モデルを作成した。このモデル細胞を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として備えたプロモータの−1367塩基対(bp)から+35bpまでを含む領域のプロモータ活性を調べた。アディポネクチンプロモータの僅か156bpを含むプラスミドを導入した脂肪細胞で高レベルのルシフェラーゼ活性が検出された。一方、肥大脂肪細胞では、アディポネクチン遺伝子上流調節領域の217bpを備えたリポーター遺伝子のみ発現の抑制が示された。
- [0008] 電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)では、アディポネクチン遺伝子の転写開始点から−188位から−157位までの32bpフラグメントが、脂肪細胞および脂肪組織との双方からそれぞれ調製した核抽出物中のタンパク質と結合することが示された。大型脂肪細胞に比して小型脂肪細胞において、又は肥満したマウスに比して痩せたマウスの脂肪組織において、これら細胞または組織より調製された核抽出物に、32bpエレメントの電気泳動度を遅延させる物質が多く存在していた。酵母one-hybridスクリーニング法を用いて、上記32bpフラグメントに結合する核内因子を特定した。one-hybridスクリーニングで得られた6個の陽性因子をさらにEMSA及び染色体免疫沈降アッセイにより解析し、クルッペル(Kruppel)様因子9(以下、「KLF9」と略す)を同定した。このKLF9は上記エレメントに結合し、その結合量は、in vitro及びin vivo

でのKLF9の発現レベルと相関していた。加えて、コトランスフェクション実験から、KLF9の一過的な過剰発現によりアディポネクチンプロモータ活性を用量依存的かつ特異的に増強させることが示された。in vitroでのsiRNAによるKLF9発現抑制並びにKLF9過剰発現及びin vivoでのKLF9ノックアウトによって、内在性アディポネクチンmRNAが変化するという結果が得られた。このことよりKLF9によりアディポネクチンの転写調節が行われていることを確認した。これら結果は、大型化した肥大脂肪細胞にKLF9を補足することにより、肥満症またはこれに関連する疾患、例えば、インスリン抵抗性及び2型糖尿病などの代謝性疾患や心血管疾患の予防・治療薬となり得ることを示唆する。さらに、KLF9が上記疾患に対する創薬のターゲットとして重要であることを示す。本発明はこれら知見に基づくものであり、具体的には以下に示す通りである。

- [0009] 1. 下記(1)または(2)記載のタンパク質を含有する、アディポネクチン発現誘導剤。
- (1)配列番号:2記載のアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (2)配列番号:2記載のアミノ酸配列において、一以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を有するアミノ酸配列からなるタンパク質
2. 下記(1)または(2)記載のDNAまたは該DNAを保持したベクターを含有する、アディポネクチン発現誘導剤。
- (a)配列番号:1記載の塩基配列を有するDNA
 - (b)配列番号:1記載の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。
3. 上記1または2に記載のアディポネクチン発現誘導剤を有効成分とする、代謝性疾患または心疾患の予防・治療用医薬組成物。
4. 下記(1)または(2)からなるエンハンサーエレメントを少なくとも備えたレポーター遺伝子を保持した、アディポネクチン発現誘導物質のスクリーニング用細胞。
- (1)配列番号:5記載の塩基配列からなるDNA
 - (2)配列番号:5記載の塩基配列において、1塩基以上の欠失、付加、置換または挿入を有する塩基配列からなるDNA
5. さらにKLF9をコードしたDNAを保持した、上記4記載の細胞。
6. 脂肪細胞である、上記4または5記載の細胞。

7. 肥大脂肪細胞である、上記4または5記載の細胞。

8. 下記(1)から(3)の工程を含む、アディポネクチン発現誘導物質のスクリーニング方法。

(1) 上記4記載の細胞に被検物質を作用させる工程

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

9. 下記(1)から(3)の工程を含む、アディポネクチン発現誘導物質のスクリーニング方法。

(1) 上記5記載の細胞に被検物質を作用させる工程

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

10. 下記(1)から(3)の工程を含む、肥満症またはこれに関連する疾患の予防・治療用薬剤のスクリーニング方法。

(1) 上記4記載の細胞に被検物質を作用させる工程

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

11. 下記(1)から(3)の工程を含む、肥満症またはこれに関連する疾患の予防・治療用薬剤のスクリーニング方法。

(1) 上記5記載の細胞に被検物質を作用させる工程

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

図面の簡単な説明

[0010] [図1]脂肪細胞の分化及び肥大過程の3T3L1細胞におけるトリグリセリド含有量(TG)(a)、グルコース摂取(b)、並びにアディポネクチン及びレジスチンのmRNAレベル

(c)を示すグラフである。(c)脂肪細胞の分化及び肥大過程における3T3L1脂肪細胞中のアディポネクチン及びレジスチンのmRNAレベルは、TaqManリアルタイム逆転写-PCR分析より測定した。結果は36B4mRNAレベルを基準としてアディポネクチン又はレジスチンの発現レベルを標準化した相対値として示した。データは、3回の独立した一連の実験から得られた平均的な結果を表す。脂肪細胞肥大は3T3L1脂肪細胞におけるアディポネクチンmRNAレベルを低下させ、このmRNAの低下に伴ってグルコース取込が低下する。

[図2]脂肪細胞の分化及び肥大過程の3T3L1細胞におけるアディポネクチンプロモータ活性を測定した結果を示す図である。a:脂肪細胞の分化及び肥大過程の3T3L1細胞におけるアディポネクチンプロモータ活性、b:分化誘導後10日目の3T3L1細胞を指示した濃度のTNF α とともにインキュベーションした後のアディポネクチンプロモータ活性、c:TNF α (3ng/ml)処理または非処理の分化誘導後10日目および分化誘導後19日目の3T3L1細胞を抗TNF α 抗体とともにインキュベーションした後のアディポネクチンプロモータ活性の結果をそれぞれ示す。3T3L1細胞には、アディポネクチンプロモータの(-1367/+35)-ルシフェラーゼ遺伝子(Luc)発現ベクターを一時的に導入した。(b)における結果は、TNF- α 非添加時の活性を100%とした場合の相対値として示す。(b)におけるバーは、それぞれ、平均 \pm SE(n=5~7)を表す(*:P<0.05、**:P<0.01;非処理細胞と比較)。肥大脂肪細胞におけるアディポネクチンプロモータ活性の低下の原因は、TNF α 以外のシグナル伝達経路が存在する。

[図3]アディポネクチンプロモータ領域の解析結果を示す図である。a:誘導10又は19日後(それぞれ、第10日又は第19日)の3T3L1脂肪細胞にアディポネクチンプロモータ5'欠失体を備えたレポーター遺伝子をベクターに載せて一時的に導入した際のレポーター(ルシフェラーゼ)活性を検討した結果を示すグラフである。b:3T3L1脂肪細胞(第10日又は第19日)から核タンパク質抽出物を調製し、図示したアディポネクチンプロモータ5'欠失配列を³²P標識化プローブとして、EMSA分析した結果を示す写真である。示したデータは、3回の独立した一連の実験から得られた代表的な結果を表す。c:3T3L1脂肪細胞(第10日又は第19日)から核タンパク質抽出物

又は痩せた対照C57若しくは肥満モデルob／obマウスからWAT(White Adipose Tissue; 白色脂肪組織)を調製し、アディポネクチンプロモータ(−188／−157)配列を³²P標識化プローブとして用いたEMSA分析に付した結果を示す写真である。d:エンハンサーなしのベクターpGL2-tK-Lucの上流に−188／−157フラグメントを挿入し、このベクターを3T3L1脂肪細胞(第10日及び第19日)に導入してルシフェラーゼ活性を検定した結果を示すグラフである。パネルdの結果は対照ベクターの値の比として表す。結果におけるバーは3回の別個の実験の平均±SEを表す。パネルb、cのデータは、3回の独立した一連の実験から得られた代表的な結果を表す。肥大脂肪細胞では、近位32bpプロモータエレメントを通じてアディポネクチンプロモータが調節される。

[図4]3T3L1脂肪細胞(第10日)の核抽出物中のアディポネクチンプロモータ領域に結合する因子を解析した結果を示す写真である。パネルa～d、fはEMSA分析結果を示す。a:3T3L1脂肪細胞(第10日)および293T細胞からの核抽出物と、放射性標識化NF- κ B共通配列(p65部位)とを、KLF9又はNF- κ Bp65を特異的に認識する抗体存在下または不存在下でインキュベーションした際のEMSA分析結果、b:(右パネル)3T3L1脂肪細胞(左側2レーン:第10日、右側2レーン:第19日)の核抽出物とアディポネクチンプロモータ領域(−188／−157)の標識32bpオリゴヌクレオチドプローブとを抗KLF3抗体存在下、非存在下でインキュベーションした結果、(左パネル)293T細胞からの核抽出物とKLFオリゴ(KLFコンセンサス配列)とを抗KLF3抗体存在下、非存在下でインキュベーションした際のEMSA分析結果、c:3T3L1脂肪細胞(第10日)からの核抽出物をKLF9コンセンサス配列(BTE)とを抗KLF9抗体存在下、非存在下で反応させた結果、d:痩せた対照C57BL6(B6)若しくは肥満モデルob／obマウスからのWATを32bpフラグメントおよび抗KLF9抗体と反応させた結果、f:B6若しくは肥満モデルob／obマウスからのWATまたは精製FLAG-tagKLF9を32bpフラグメントとインキュベーションした結果を示す。各図面中の矢印は、スーパーシフトした特異的複合体を示す。e:3T3L1脂肪細胞(第10日)内の内在性アディポネクチンプロモータに結合しているKLF9の染色体免疫沈降アッセイの結果を示す写真である。データは、3回の独立した一連の実験から得られた代

表的な結果を表す。EMSA分析により、32bp結合複合体にはin vitro及びin vivoでKLF9を含むことが明らかにされた。

[図5]脂肪細胞内のKLF3およびKLF9の発現レベルを解析した結果を示す写真および図である。a、b:分化誘導から示された日数を経過した3T3L1脂肪細胞、痩せた対照C57BL6若しくは肥満モデルob/obマウスからのWAT(a～c)中に存在するKLF3mRNA(a、上段)またはKLF9mRNA(a、下段)の発現量をノーザン分析により解析した写真およびそのバンド強度を数値化したグラフ、mKLF9タンパク質(b)の発現量をウェスタン分析により解析した結果を示す写真である。パネルbにおける矢印はKLF9を示す。パネルaに示すグラフにおけるバーはそれぞれ、平均±SE(n=3～5)を表す。KLF9発現は、脂肪細胞分化の際に増大したが、脂肪細胞肥大の際には低下した。

[図6]KLF9過剰発現によるアディポネクチン発現に与える効果を解析した結果を示す図および写真である。a:3T3L1脂肪細胞(第19日)にKLFを発現するベクター(KLF9/pcDNA3.1)と、アディポネクチンプロモータ((-1367/+35)の下流にレポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子を備えたベクター(「1367bp-Luc」)を導入し、KLF9高発現の影響を解析した結果を示す。結果は「Mock」(pcDNA3.1のみ)を1とした場合の比活性として示した。PDGFはKLF認識配列を備えKLFファミリーの発現を誘導する陽性のコントロールである。b:3T3L1脂肪細胞(第19日)にKLF9/pcDNA3.1をリポフェクション法により導入した際のKLF9mRNA発現量をTaq-manPCRにより測定した結果を示す。1/3000、1/1000はリポフェクション法でベクター導入した際の希釈率を示し、「0」は非導入の場合を示す。c:レポーターとしてPDGF-tk-Lucまたは32bp-tk-lucを保持した3T3L1脂肪細胞(第19日)にmKLF5/pcDNA3.1またはmKLF9/pcDNA3.1を導入した際のレポーター遺伝子の発現上昇率を、非導入の場合の活性比として示す。d:3T3L1脂肪細胞(第19日)にレトロウイルスベクターを用いてKLF9遺伝子を安定的に導入した際のKLF9の発現量を測定した結果を示す。縦軸「mKLF9/36B4」は、36B4mRNA発現量で補正したKLF9mRNA発現率を意味する。f:3T3L1脂肪細胞(第19日)にレトロウイルスベクターを用いてKLF9遺伝子を安定的に導入した際のアディポネクチン発現量を測定した結果を示す。e:K

LF9をレトロウイルスを用いて導入された3T3L1脂肪細胞(第19日)からの核タンパク質抽出物を調製し、アディポネクチンプロモータ(−188/−157)配列を³²P標識化プローブとして用いたEMSA分析に付した結果を示す写真である。図中に示すバーは、それぞれ平均±SE(n=5~7)を表す。KLF9は、エンハンサー及びアディポネクチンプロモータの活性、32bp結合タンパク質の量、並びにアディポネクチンの発現を増大させた。

[図7]siRNAによりKLF9をノックダウンした際のアディポネクチン発現への影響を解析した結果を示す図および写真である。a:KLF9に対するsiRNAを3T3L1脂肪細胞(第10日)に導入後、72時間、96時間経過後のKLF3、KLF9及びアディポネクチンmRNAの量を示す。結果はそれぞれsiRNAを導入していない際の活性を100%とした際の相対割合で示した。b:3T3L1脂肪細胞(第10日)にsiRNAを導入後72時間または96時間経過後の細胞から核タンパク質抽出物を調製し、アディポネクチンプロモータ(−188/−157)配列を³²P標識化プローブとして用いたEMSA分析結果を示す写真である。siRNAによるKLF9発現の抑制は、32bp結合タンパク質の量及びアディポネクチンの発現をin vitroで低下させた。

[図8]KLF9ノックアウトマウス又は対照の野生型同腹仔のWATから核タンパク質抽出物を調製し、KLF9共通配列(BTE)又はアディポネクチンプロモータ(−188/−157)配列を³²P標識化プローブとして用いてEMSA分析を行った結果を示す写真である。KLF9のノックアウトは、KLF9タンパク質を消失させ、32bp結合タンパク質も消失させた。

[図9]脂肪細胞肥大が脂肪細胞におけるKLF9発現を調節する機序を示す図である。a:3T3L1脂肪細胞(第10日又は第17日)におけるTR α (甲状腺ホルモンレセプター α)mRNA発現量、b:痩せたマウスC57BLおよび肥満マウスob/obにおけるTR α mRNA発現量を示す。c:図示された濃度のT3で処理した際のKLF9mRNA発現量を36B4mRNA発現量との比として示す。d、e:3T3L1脂肪細胞(第6日、第13)、抗酸化剤のN-アセチルシステイン(NAC)(20mM)、JNKインヒビターのSP600125またはNAC(SP)で処理した3T3L1脂肪細胞(第19日)におけるKLF9またはアディポネクチンのmRNA発現量を示す。なお図において、NAC(SP)は、NAC

およびSP600125で処理した群である。

[図10]脂肪細胞の肥大化に伴い酸化ストレスが上昇することを示す図である。

[図11]脂肪細胞の肥大化に伴い抗酸化活性が低下することを示す図である。バーは、それぞれ、平均±SE (n=6)を表す(**:P<0.01;非処理細胞と比較)。

発明を実施するための最良の形態

- [0011] 以下、実施形態に挙げて本発明を説明する。本発明は、第一にアディポネクチン発現誘導剤を提供する。本願発明者らにより、KLF9がアディポネクチンの発現を誘導することが見出された。すなわち、本発明のアディポネクチン発現誘導剤は、KLF9タンパク質またはKLF9を発現し得るDNA等を構成成分とする。
- [0012] KLF9はクルップル様ジンクフィンガータンパク質と称されるスーパーファミリーに属するタンパク質の一種である。KLF9の具体的なアミノ酸配列の一例を配列番号:2に示すが、本発明のKLF9はこれに限定されない。タンパク質には同一の機能を有する類似の配列からなる異種ホモログや変異体が存在し、また、配列番号:2記載のアミノ酸配列を人為的に適宜改変することによって、同一の機能を有する変異体を得ることもできる。従って、配列番号:2に示すアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつアディポネクチン遺伝子を誘導する活性を有するタンパク質も本発明のKLF9に包含される。
- [0013] KLF9はヒト、マウスなどの細胞、組織より得ることができる。例えば、脂肪細胞でも小型のものはKLF9の発現が高いことから、分化が進んでいない脂肪細胞、組織を材料として単離することができる。また簡便には配列番号:1記載のDNAを発現ベクターに接続し、細胞系、無細胞系で発現させて得ることもできる。
- [0014] 一方、配列番号:2記載のアミノ酸配列からなるKLF9と機能的に同等なタンパク質を得る手法として、アミノ酸を人為的に置換することが挙げられる。性質的に似たアミノ酸同士の置換はタンパク質の活性が維持されやすいと考えられる。保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、

フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などが挙げられる。逆にアミノ酸配列の非保存的置換も場合によっては有効である。例えば、非保存的置換によって、KLF9タンパク質におけるアディポネクチン発現誘導活性を上昇等し得る改良を加えることも可能であり、該改良KLF9タンパク質も本発明に含まれる。

[0015] KLF9と機能的に同等なタンパク質を得る他の方法として、配列番号:2記載のDNAと類似するDNAをハイブリダイゼーションによりクローニングして、得られたDNAからタンパク質を得る方法を挙げることができる。具体的には、配列番号:1に示すKLF9をコードするDNA、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズするDNAを単離する。ハイブリダイゼーションをストリンジентな条件下で実施すれば塩基配列としては相同性の高いDNAが選択され、その結果として単離されるタンパク質にはKLF9と機能的に同等なタンパク質が得られる可能性が高い。相同性の高い塩基配列とは、たとえば70%以上、望ましくは90%以上の同一性を示すことができる。

なお、上記ストリンジентな条件とは、例えば6×SSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といった条件を示すことができる。ストリンジエンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右されるが、当業者であればこれらの条件を必要なストリンジエンシーを得られるように設定することは自明である。

[0016] ハイブリダイゼーションを利用することによって、例えば、配列番号:2記載のアミノ酸配列に示すようなマウス由来のKLF9、マウス以外の動物種、すなわちヒト、ラット、ウサギ、ブタ、あるいはヤギ等の動物種から得ることができるポリヌクレオチドがコードするKLF9のホモログは、機能的に同等なタンパク質を構成するであろう。

[0017] 上記手法以外にもKLF9と機能的に同等なタンパク質を得る方法として、配列番号:1記載のDNAを改変し、改変したDNAを基にタンパク質を合成する方法などが挙げられる。マウスKLF9(配列番号:2)に人為的に改変を加えたタンパク質や、上記のようなハイブリダイゼーション技術等を利用して単離されるポリヌクレオチドがコードするタンパク質は、通常、ヒトKLF9(配列番号:2)とアミノ酸配列において高い相同性を有

する。高い相同性とは、少なくとも30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上(例えば、95%以上)の配列の同一性を指す。塩基配列やアミノ酸配列の同一性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイトを利用して行うことができる[例えば日本DNAデータバンク(DDBJ)において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、および SSEARCH 等の相同性検索が利用できる[例えば日本DNAデータバンク(DDBJ)のウェブサイトの相同性検索(Search and Analysis)のページ；

<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において、BLASTを用いた検索を行うことができる(例えばNCBIのホームページのウェブサイトのBLASTのページ；

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402)]。

KLF9と機能的に同等なタンパク質が、実際に配列番号:2記載のKLF9と同等な機能、すなわち、アディポネクチン発現誘導活性を有するかを確認は、本願実施例に示すルシフェラーゼ解析などを用いて実施し得る。

[0018] 本発明のアディポネクチン発現誘導剤のもう一つの構成成分は、KLF9をコードしたDNAまたは該DNAを保持したベクターである。KLF9をコードしたDNAの例として、配列番号:1に示す塩基配列からなるDNAを挙げることができる。DNAもタンパク質と同様に同一の機能を有する類似の塩基配列からなるホモログや改変体が存在し、また、配列番号:1記載の塩基配列を人為的に改変することによって、あるいは同一の機能を有する変異体をクローニングすることによっても得ることもできる。こうした配列番号:1に類似する配列を備えたDNAは、例えば、配列番号:1記載の塩基配列とストリンジентな条件でハイブリダイズするDNAと定義することができる。

[0019] 「ストリンジентな条件でハイブリダイズするDNA」とは、上述した通り、配列番号:1に示すKLF9をコードするDNA、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズし得るDNAである。また、上記ストリンジентな条件とは、一例を示せば、上述した通り、例えば 6×SSC、40%ホルムアミド、25℃でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55℃での洗浄といった条件などであるがこれに限定されない。

KLF9をコードしたDNAは断片の状態でもよく、またベクターに接続しても用いてもよい。ベクターは目的に応じて適宜選択し得る。例えば、ヒト細胞、組織内のアディポネクチン遺伝子の発現を誘導する目的では、ヒトなどの哺乳動物細胞等で機能し得るベクター、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、pcDNAI、pcDNAI/Amp (Invitrogen社) 等がある。

[0020] 上記本発明のアディポネクチン発現誘導剤の使用態様は、(1) 実験動物における内因性あるいは外来性アディポネクチン遺伝子発現の誘導、(2) 培養細胞内に存在する内因性あるいは外来性アディポネクチン遺伝子発現の誘導、(3) 無細胞系でのアディポネクチン遺伝子の発現誘導などが挙げられる。

上記使用態様(1)、(2)の場合には、例えば、ベクターに保持させたKLF9をコードしたDNAを構成成分としたアディポネクチン発現誘導剤を用いることが好適である。細胞、組織等への遺伝子導入は、ウイルスベクターの投与や既存の導入技術(エレクトロポレーション法、リポフェクション法、リン酸カルシウム沈殿法等)を用いて行うことができる。また、使用態様(3)の場合には、DNAを保持したベクターまたはKLF9タンパク質のいずれを構成成分とするものであってもよい。

[0021] 上記本発明のアディポネクチン発現誘導剤は、実験動物、培養細胞さらには無細胞系においてアディポネクチンの発現を誘導し得ることから、アディポネクチンの機能解析の有効な薬剤となる。また、アディポネクチンは肥満症またはこれに関連する疾患、例えば、糖尿病などの代謝疾患および動脈硬化症などの心血管性疾患に関与する重要な因子である。従って、本薬剤はこうした疾患の研究に大きく寄与する。

[0022] また、本発明は第二に上記アディポネクチン発現誘導剤を有効成分とする、肥満症またはこれに関連する疾患の予防・治療用医薬組成物に関する。上述した通り、アディポネクチンは肥満症またはこれに関連する疾患、例えば2型糖尿病、インスリン抵抗性などの代謝疾患および動脈硬化症などの心血管性疾患に関与する重要な因子である。これら疾患の多くでは低アディポネクチン血症がみられる。従って、上記アディポネクチン発現誘導剤を有効成分として、適宜、薬学的に許容され得る担体と配合することにより、肥満症またはこれに関連する疾患の治療用医薬組成物として応用

することができる。

- [0023] 本発明の医薬組成物が対象とする疾患は、肥満症またはこれに関連する疾患、例えば、代謝性疾患、心疾患などである。具体的には、インスリン抵抗性、糖尿病及び高脂血症などの代謝性疾患、動脈硬化症、高血圧、脂肪肝などの心血管性疾患などである。さらに言えば、これら疾患のうち、特に低アディポネクチン血症を伴う場合あるいは低アディポネクチン血症を生じるおそれがある場合に本発明の医薬組成物が有効となる。これら疾患の原因またはこれら疾患に伴って生じる低アディポネクチン血症を本医薬組成物中に含まれるアディポネクチン発現誘導剤により改善することにより、上記疾患の予防、治療、病体の緩和などを図ることができる。
- [0024] アディポネクチン発現誘導剤は上記で説明した通りである。「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤あるいはその他の添加剤等を意味する。そのような担体の一つ以上を用いることにより、経口あるいは非経口製剤を調製し得る。本発明による医薬組成物の投与量は、対象疾患や病態に応じて適宜調整することができるが、一般的には、体重1kgあたり通常1 μ gから20g、より一般的には10 μ g～500mgとすることができる。また注射剤の場合は経口投与の10分の1～100分の1程度を投与量の目安とすることができる。
- [0025] 本発明は、第三にアディポネクチン発現誘導剤のスクリーニングのための細胞を提供する。本発明者らは、アディポネクチン遺伝子の制御領域内にKLF9が結合するエレメントを同定している。そして、このエレメントにKLF9が結合することによりアディポネクチンの発現が促進される。したがって、KLF9と同様な活性を有する物質を探索することによりKLF9に代わるアディポネクチン発現誘導因子をスクリーニングすることが可能となる。この因子がKLF9などのようなタンパク質であってもよいが、好ましくは低分子化合物である。低分子化合物であれば、そのまま創薬のリード化合物として利用し得る可能性が高い。
- [0026] 本発明の細胞の第一の態様は、KLF9が結合し得るエレメント(以下、「KLF9結合エレメント」と称する)を少なくとも上流に備えたレポーター遺伝子を保持した細胞である。すなわち、第一の態様の細胞内には、KLF9によるアディポネクチン遺伝子の発現を促進するエンハンサーエレメント(シス因子)であるKLF9結合エレメントがレポータ

一遺伝子の上流に備えられている。

[0027] KLF9結合エレメントは、好適には、アディポネクチン遺伝子の上流-188から-157の領域に対応する配列番号:5記載の塩基配列を挙げることができる。しかし、この配列に限定されるものではなく、配列番号:5記載の塩基配列を有するアディポネクチン遺伝子の制御領域の全長(配列番号:3)あるいはその一部(一例として挙げれば、配列番号:4)がレポーター遺伝子の上流に備えられているものであってもよい。さらにはKLF9が結合し、且つ、KLF9によるアディポネクチン遺伝子発現を誘導し得る活性を保持している配列であれば、配列番号:5記載の塩基配列を改変することもできる。配列番号:5記載の塩基配列の改変体をより具体的に定義すると、配列番号:5記載の塩基配列において1塩基以上の欠失、付加、置換または挿入を有する塩基配列とすることができる。なお、こうした配列番号:5記載の塩基配列の改変は点変異導入技術を用いて実施し得る。

[0028] レポーター遺伝子は、その発現を確認し得る遺伝子であれば特に限定なく、一般に用いられている用語よりも広い概念として本書では用いる。具体的には、本書におけるレポーター遺伝子は、発光を指標に発現を検出し得る遺伝子(例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子、YFP遺伝子など)、酵素活性を指標に発現を検出し得る遺伝子(β -ガラクトシダーゼ遺伝子など)、薬剤の感受性を指標に発現を検出し得る遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子など)など一般的なレポーター遺伝子(マーカー遺伝子)の他に、アディポネクチン遺伝子そのものもレポーター遺伝子の概念に含めることができる。なお、本書においては、特に断りがない限り「レポーター遺伝子」は広義に解する。

[0029] すなわち、「KLF9結合エレメントを上流に備えたレポーター遺伝子」として、固有の制御領域(例えば、配列番号3など)を備えたアディポネクチン遺伝子、例えば、配列番号:6を用いることができる。この構成におけるアディポネクチン遺伝子を他の上述したような一般的なレポーター遺伝子に置換してもよい。さらに、これら構成において、制御領域のうちKLF9結合エレメント(例えば、配列番号:5)のみ残すように他の制御領域を欠失させてもよい。また、一般のレポーター遺伝子が搭載されたプラスミドを基に、レポーター遺伝子の上流配列をアディポネクチン遺伝子の制御領域につなぎ

変えて構築してもよく、また、一般のレポーター遺伝子上流にKLF9結合エレメントを挿入して構築してもよい。なお、アディポネクチン遺伝子をレポーター遺伝子として用いる場合には、アディポネクチン遺伝子は細胞に内在する遺伝子あるいは外来から導入された遺伝子のいずれであってもよい。

[0030] 本発明の細胞の第二の態様は、上記第一の態様にさらにKLF9をコードしたDNAを保持した細胞である。第一の態様にさらにKLF9遺伝子を保持させた第二の態様の細胞は、KLF9遺伝子の発現誘導を介してアディポネクチン遺伝子の発現を誘導し得る物質のスクリーニングに有用となる。本願発明者らは、脂肪細胞の肥大化の過程でアディポネクチンの発現が低下することと相関してKLF9遺伝子の発現、特に、転写レベルの発現が低下することを見出している。従って、第二の態様の細胞は、第一の態様の細胞の有用性に加えて、大型あるいは肥大脂肪細胞においてKLF9遺伝子の発現を抑制している物質を阻害する物質の探索などに有用となる。

[0031] 「KLF9をコードしたDNA」は、上記アディポネクチン発現誘導剤の説明において記載したKLF9をコードしたDNAと同一であり、この用語が意味する範囲も同様である。要するに、KLF9をコードしたDNAの一例として配列番号:1記載の塩基配列からなるDNAを挙げることができるが、アディポネクチンの発現を誘導し得る活性を保持する範囲で、配列番号:1の塩基配列にこの塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAが含まれる。なお、KLF9をコードしたDNAは細胞に内在しているものであっても、外来から導入した細胞であってもよい。これらKLF9をコードしたDNAは、上流にKLF9遺伝子由来の制御領域を備えていることが好ましい。

[0032] 上記第一および第二の態様における細胞種は、特に限定はないが、例えば、哺乳動物細胞由来であることが好ましく、さらに通常生体内でアディポネクチンを発現している細胞種であることがより好ましい。生体内でアディポネクチンを発現している細胞は、一例を挙げれば、脂肪細胞である。脂肪細胞を用いる場合には、小型脂肪細胞、大型化した肥大脂肪細胞を適宜選択して用いることができる。例えば、第二の態様の細胞で、KLF9の発現を抑制している生体分子を阻害する物質の探索を行う場合には、アディポネクチンの発現が低下している大型化脂肪細胞を用いることができる。大型脂肪細胞の調製は、ob/obマウスなどから脂肪細胞を単離調製する以外に、

分化が進んでいない脂肪細胞(例えば、3T3L1脂肪細胞など)を出発材料として、実施例を参照して分化誘導を行い調製することもできる。脂肪細胞の分化誘導は、分化誘導培地で細胞を培養することにより実施することができる。

[0033] また、第一、第二の態様の細胞における「KLF9結合エレメントを上流に備えたレポーター遺伝子」や第二の態様の細胞における「KLF9をコードする遺伝子」を外来から細胞に導入する場合、このDNAをベクター等に担持させて細胞に導入することができる。この場合のベクターは適宜選択して使用することができる。

[0034] 本発明は第四に、アディポネクチンの発現を誘導し得る物質のスクリーニング方法に関する。第一の態様のスクリーニング方法は、上記第一の態様の細胞を用いた方法である。具体的には、次の(1)から(3)の工程が含まれる。

(1) 上記第一の態様の細胞に被検物質を作用させる工程

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

[0035] 第二の態様のスクリーニング方法は上記第二の態様の細胞を用いた方法であり、具体的には、次の(1)から(3)の工程が含まれる。

(1) 上記第二の態様の細胞に被検物質を作用させる工程、

(2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程

(3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程

[0036] いずれの態様も目的であるアディポネクチン遺伝子の発現を誘導し得る物質を探索し得る点で共通するが、用いる細胞の機能に応じた特徴を有する。例えば、第一の態様では、KLF9結合エレメントを備えたレポーター遺伝子を保持した細胞を用いていることから、KLF9に代わってKLF9結合エレメントに作用しアディポネクチンの発現を誘導し得る物質をスクリーニングすることが可能となる。また、第二の態様では、さらにKLF9をコードしたDNAを保持した細胞を用いていることから、例えば、肥大脂肪細胞においてKLF9の発現抑制を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

[0037] 上記第一および第二の態様における被検物質は、タンパク質、核酸、低分子化合

物などを挙げることができるが、特に限定はない。また、これらは天然、合成の別は問わない。核酸には、KLF9タンパク質の全体をあるいは一部を模倣した核酸(DNA、RNA)デコイを含めることができる。また、核酸は天然に存在する塩基のほか、天然には存在しない人工的な塩基により合成したものも含めることができる。低分子化合物には、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物ライブラリーなどを含めることができる。

[0038] 細胞への被検物質の作用は、一例として、細胞を培養している培地に被検物質への添加することが挙げられる。被検物質が核酸の場合には、通常の遺伝子導入技術、例えば被検物質をリポソームなどの脂質分子、リン酸カルシウムなど塩で覆い細胞の食作用を利用して導入する方法、電気的な刺激などにより細胞へ導入する方法、マイクロインジェクション、ジーンガンなどを用いることができる。

[0039] レポーター遺伝子の発現の検出は、転写レベル、翻訳レベルの発現のいずれを検出してもよい。転写レベルの発現検出は、ノーザンブロッティング、RT-PCR法、リアルタイムPCRなどを用いることができる。これら手法に用いるプライマー、プローブは、当業者であればレポーター遺伝子の塩基から適宜デザインして作成することはできる。翻訳レベルの発現検出は、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA、RIAなど特異抗体を用いた検出方法の他に、レポーター遺伝子産物の性質に応じた方法を用いることができる。ルシフェラーゼ、GFPなどの蛍光を発する場合には、その蛍光を検出することにより、 β -ガラクトシダーゼなどの酵素の場合には、基質との反応に基づき検出することができる。さらに、薬剤耐性マーカーの場合には、薬剤含有培地中に培養し、生育することを指標に発現を検出することができる。発現量を定量化する場合には、上記特異的な抗体を用いたいずれかの検出手法や、強度を測定し得る蛍光を指標とする方法を用いることが好ましい。

[0040] 第一、第二の態様のいずれも、最終的には、被検物質存在下と非存在下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、被検物質非存在下に比して被検物質存在下においてレポーター遺伝子の発現が高い結果をもたらす被検物質が選択される。ここで選択された被検物質は、アディポネクチン遺伝子の発現を促進し得る物質として重要な候補となる。

また、上記本発明のスクリーニング方法は、アディポネクチン発現誘導物質をスクリーニングし得るのみならず、さらには、肥満症またはそれに関連した疾患の予防・治療用の薬剤の候補物質を探索するために応用することができる。肥満症に関連した疾患としては、上記において繰返し記載している通り、例えば、糖尿病、インスリン抵抗性などの代謝性疾患、動脈硬化症などの心疾患などである。これら疾患では、低アディポネクチン血症が見られる場合多く存在する。低アディポネクチン血症が、これら疾患の発症を決定づける一要素、あるいは病態の進行を進める要因等となっている場合には、上記スクリーニング方法により得られる物質は、患者における低アディポネクチン血症を改善させ、肥満症またはこれに関連する疾患の予防、治療、病体の緩和を誘導し得ることが期待される。

- [0041] なお、上記スクリーニング方法の他に簡便なスクリーニング方法として、配列番号:5に示すようなKLF9結合エレメントと相互作用活性を指標に被検物質を選択する方法もある。相互作用活性は、例えば実施例に示された免疫沈降アッセイや、EMSAなどを用いて測定し得る。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

- [0042] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本実施例で用いた材料および方法について以下に説明する。

〔材料及び方法〕

1. 材料及び一般的方法

3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX)及びデキサメタゾン(DEX)、NAC並びにSP600125は、シグマ社から購入した。その他の材料は、すべて、引用文献(27、35及び36)に示された供給源から購入した。DNA配列決定は、PRISM染料ターミネーターサイクル配列決定キット及びABI PRISM310ジェネティックアナライザー(Applied Biosystems社)で実施した。

- [0043] 2. 動物及び血液サンプルアッセイ

KLF9欠損マウスは既に報告されている (Morita, M. et al., Mol. Cell. Biol. 23, 2489-2500 (2003).)。15週齢のob／obマウス及びその野生型のC57BL／6マウスは、Charles River Breeding Laboratories (Wilmington, MA) から入手した。マウスは、コロニーケージ内に収容し、光源下12時間／暗所12時間の周期を維持した。血漿グルコースレベルは、グルコースB試験 (和光純薬化学、大阪市) を用いて決定した。血漿アディポネクチンレベルは、マウスアディポネクチン・ラジオイムノアッセイ (RIA) キット (LINCO Research Inc.) によって決定した。

[0044] 3. cDNAライブラリー

cDNAライブラリーは、A. Saltielから提供されたものを用いた。このライブラリーは完全に分化した3T3-L1脂肪細胞から採取したcDNAをpGAD-GH GAL4ベクター内に挿入することにより構築された (Ribon, V. et al., Mol. Cell. Biol. 18, 872-879 (1998).)。ライブラリーにはすべてが1.5～3kbの大きさのcDNAインサートを有する、10,000,000個体の形質転換体が含まれていた。

[0045] 4. 酵母におけるone-hybridクローニング

酵母におけるone-hybridクローニングの一般的方法及び関連する実験的操作は、すでに報告されている手順で実施した (Almoguera, C. et al., J. Biol. Chem. 277, 43866-43872 (2002).)。one-hybridクローニングのためにYM4271 (Clontech社) の酵母誘導株を構築した。具体的には、プラスミドpHISi (Clontech社) のXbaI部位 (クレノウDNAポリメラーゼで末端充填) とEcoRI部位との間に、下記に示すアディポネクチンプロモータ配列由来の32塩基 (－188位～－157位、図3b、配列番号:5) からなるトップ鎖オリゴヌクレオチドとその相補鎖とのアニーリングによって生成されたDNAフラグメントを挿入した。

5'-GAAGCCCAAGCTGGGTTGTACCAGGTTCCCTA-3' (トップ鎖)

上記反応産物をYM4271 (Clontech社) に形質転換し、上記アニーリング断片が三量体となったインサートを含むHIS3リポーター遺伝子コンストラクト ((G4HSE) x3 :: HIS3) を含むクローンを得た。

one-hybridスクリーニングのため、1,660,000のプライマリークローンの増幅後に、胚cDNAライブラリーから調製したDNAで(32bp) x3 :: HIS3リポーター酵母株を形質

転換した。500万の酵母形質転換体を15mM3-アミノトリアゾール(SD-, His-, Leu+)上で培養した。30°Cで4~8日間増殖させた後、22の陽性と推定される酵母クローンを選び、更に分析した。二つのcDNAが、同じKLF9をコードしていた。

[0046] 5. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは、以前に報告した方法に従い12ウェルプレートで培養した細胞を用いて実施した(Yamauchi, T. et al., Nature 423, 762-769 (2003)., Shindo, T. et al., Nat. Med. 8, 856-863 (2002).)。それぞれ指定量の発現プラスミドとともに、ルシフェラーゼリポータープラスミド(0.25 μ g)及びpSV- β gal(0.1~0.4 μ g)を同時に導入した。各トランスフェクションでのDNAの総量を、対照のベクターDNAで1.5 μ g/ウェルに調整した。形質転換体のルシフェラーゼ活性の量を標準的キット(Promega)により測定した。測定値は β -ガラクトシダーゼ活性を基準に標準化した。

[0047] 6. ゲル移動度シフトアッセイ(Electrophoresis mobility shift assay: EMSA)

ゲル移動度シフトアッセイは、以前に記載したとおりに実施した(Almoguera, C. et al., J. Biol. Chem. 277, 43866-43872 (2002).)。

293T細胞若しくは3T3L1脂肪細胞又は白色脂肪組織から核酸抽出物を報告されている方法に従い調製した(Almoguera, C. et al., J. Biol. Chem. 277, 43866-43872 (2002).)。ゲル移動度シフトアッセイに用いた二本鎖オリゴヌクレオチドは、両鎖をアニーリングすることによって調製した。標識化プローブ(3,000~10,000cpm)および核酸抽出物を反応液(20 μ l:10mMトリスHCl(pH7.6)、50mMKCl、0.05mMEDTA、2.5mMMgCl₂、8.5%グリセリン、1mMジチオトレイトール、0.5 μ g/mlのポリ(dI-dC)、0.1%トリトンX及び1mg/mlの脱脂乳)中で混合し、氷上で30分間インキュベーションした。DNA-タンパク質複合体を、4.6%ポリアクリルアミド上、140V、4°Cで1時間分画した。ゲルを乾燥し、BAStationソフトウェア付きのBAS2000フィルター(富士写真フィルム)に露光させた。

競合実験の場合には、標識化DNAに対して少なくとも100倍過剰モルの非標識化DNAを先ず上記反応液に加え、その後、標識化プローブを加えた。スーパーシフト実験では、最初に、KLF9、KLF3又はNF- κ Bp65に対するポリクローナル抗体

(2~10 μ g)とともに氷上でインキュベーションして、ゲルシフト反応を行った。

[0048] 7. レトロウイルスの生成及び感染

10⁷個のPlat-Eパッケージング細胞(Morita, S. et al., Gene Ther. 7, 1063-1066 (2000).)に10 μ gのマウスKLF9をLipofectamine PLUS(Life Technology)を用いて一時的に導入し、24時間のインキュベーションの後に上清(10ml)を採集した。10 μ g/mlのポリブレン(臭化ヘキサジメトリン、Sigma社)を添加して20倍希釈した上清を用い、推定多重感染度0.3にて3T3L1脂肪細胞を感染させた。

[0049] 8. プラスミド

アディポネクチンプロモータの1367bp(-1367から+35;配列番号:4)、527bp(-527から+35)、217bp(-217から+35)及び127bp(-127から+35)のフラグメントを有するルシフェラーゼ遺伝子構成体(それぞれ、「pAdiponectin1367-Luc」、「pAdiponectin527-Luc」、「pAdiponectin217-Luc」及び「pAdiponectin127-Luc」)をpGL2ベシック又はpGL2プロモータベクター(Promega社)内にサブクローニングした。

[0050] 9. 哺乳動物細胞での発現

pCDNA3.1のEcoR1/Not部位に結合することによって、KLF3又はKLF9発現ベクターを構成した。293T又は3T3L1脂肪細胞へのDNAトランスフェクションは「Lipofectamine PLUS」(Gibco BRL)を用いたリポフェクション法によって実施した。

[0051] 10. 3T3L1細胞による研究

3T3L1細胞を10%ウシ胎児血清とともにDMEM中で培養し、すでに報告されている方法に従って(Yamauchi, T. et al., Nat. Genet. 30, 221-226 (2002).)、脂肪合成性細胞への分化誘導を行った。簡略的に説明すると、まず、3T3L1細胞を培養し、密集するまで増殖させた。2日後、培地を標準分化誘導培地(0.5mM IBMX、1 μ M DEX、5 μ g/mlのインスリン、10%FBS、50単位/mlのペニシリン及び50 μ g/mlのストレプトマイシン含有)に交換し、一両日ごとに培地交換を行った。既知の方法でグルコース摂取を決定した(Yamauchi, T. et al., Nat. Med. 8, 1288-1295 (2002).)。細胞溶解物を抽出し、そのTG含量を、既知の方法(Yamauchi, T. et al., Nat. Med. 7, 941-946 (2001).)で決定した。

[0052] 11. RNA干渉

相補的な一本鎖RNAをそれぞれ化学的に合成し、互いにアニーリングしてsiRNAを調整した。60～70%程度まで密集した3T3L1脂肪細胞にLipofectamine PLUS (Life Technology)を用いてsiRNAを導入した(Yamauchi, T. et al., Nature 423, 762-769 (2003).)。これらKLF9及びKLF3に対するsiRNA配列は、それぞれ予めその導入によりKLF9およびKLF3の発現を抑制し得ることが確認できているものを用いた。siRNAのトランスフェクション72、96時間後に、細胞を溶解して発現産物等の解析を行った。

[0053] 12. リアルタイムPCRによる転写体のノーザンブロット分析及び定量的分析

細胞又は組織からのトータルRNAの調製は、TRIzol (Gibco/BRL)を用い、製造者のインストラクションに従って行った。ノーザンブロット分析のために、各群のトータルRNAを等量ずつ分取し、これらをプールして(総量10 μ g)、ホルマリン変性アガロース電気泳動にかけた。泳動後、ナイロン膜(Hybond N; Amersham Pharmacia Biotech)に転写した。フィルターは、マウスKLF9及びマウスKLF3cDNAを[³²P]dCTPで標識化したcDNAプローブそれぞれとハイブリダイズさせた。得られたバンドをBASstationソフトウェア付きのBAS2000フィルター(富士写真フイルム)に感光させ視覚化した。mRNAの定量は、リアルタイムPCR法により実施した(Yamauchi, T. et al., Nature 423, 762-769 (2003).)。プライマーセット及びプローブは、ソフトウェア「Primer Express 1.5a」を用いて設計し、ABI (ABI Prism; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California)から購入した。相対的な量は同じcDNA中のアクチン転写物の量で標準化した(Yamauchi, T. et al., Nature 423, 762-769 (2003).)。

[0054] 13. 核抽出物の調製及び免疫ブロット分析

既知の方法に従って(Almoguera, C. et al., J. Biol. Chem. 277, 43866-43872 (2002).)、核抽出物を調製した。核タンパク質(30 μ g)のサンプルは、KLF9(Zhang, D. et al., Endocrinology 143, 62-73 (2002).)又はKLF3(Crossley, M. et al., Mol. Cell Biol. 16, 1695-1705 (1996).)に対するウサギ免疫グロブリンG(IgG)、次いで、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合マウス又はウサギIgG及びECLキット(Amersham Pharmacia Biotech)による免疫ブロット法により解析された。

[0055] 14. 染色質免疫沈降アッセイ

休止状態の3T3L1脂肪細胞を1%ホルムアルデヒド中で固定化した。固定化された染色体サンプルは既知の免疫沈降法(Shindo, T. et al., Nat. Med. 8, 856-863 (2002).)に多少の変更を加えた方法で解析した。沈降物を回収するためにプロテインA(Upstate)を用いた。

[0056] 15. 抗酸化活性の測定

カイマン化学抗酸化性解析(Cayman Chemical Antioxidant Assay)を血漿(plasma)、血清、尿、便あるいは細胞溶解物のトータル抗酸化能を測定するために使用した。水溶性および脂溶性抗酸化剤はこのプロトコールで分けることができない。そのため、ビタミン、タンパク質、脂質、グルタチオン、尿酸などを含む成分全てを組合わせた抗酸化活性が分析される。解析は、試料中の抗酸化剤がメトミオグロビン(metmyoglobin)によるABTS^R (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate])からABTS^{R+}への酸化を阻害する活性を測定することに基づいている。試料の量は、その濃度に従い750nmにおける吸収阻害を誘導する。試料中におけるABTSの酸化を阻害し得る抗酸化活性は、水溶性トコフェロール類似体であるTroloxの抗酸化活性と対比し、ミリモル濃度のTrolox,で標準化することより定量化する。

[0057] [実施例1] アディポネクチンmRNAレベルは、肥大した3T3L1脂肪細胞で低下している

アディポネクチンmRNAレベルは、肥満症で低下しており、それが、肥満症関連インスリン抵抗性の発達の原因となる役割を果たすことが報告されている。本発明の課題は、肥満症におけるアディポネクチン発現の低下の原因となる、転写因子を単離することである。この課題に検討するために、in vitroでの肥大脂肪細胞モデルを用い、脂肪細胞肥大化がアディポネクチン遺伝子の発現に与える影響を解析した。

興味深いことに、脂肪細胞分化の誘導19日後(第19日)の3T3L1の脂肪細胞は、トリグリセリド含量が増大し(図1a)、インスリンに応答してグルコース摂取の低下のようなインスリン抵抗性を示し(図1b)、レジスチンのようなアディポカインを誘導する一層高度なインスリン抵抗性を発現し(図1c)、さらには、脂肪細胞分化の誘導10日後(第10日)の3T3L1脂肪細胞と比較して、アディポネクチンmRNA発現が低下する(

図1c)ことが見出された。mRNAレベルで観察された変化と同様に、脂肪細胞肥大はアディポネクチンのタンパク発現レベルも低下していた(データ示されず)。これらより肥大脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子の発現低下の原因は、転写レベルの低下であることを示唆する。

[0058] [実施例2] 肥大脂肪細胞で低下したアディポネクチンの発現の原因には、TNF α 以外のシグナル伝達経路が関与する

以前のアディポネクチン遺伝子の5'フランキング領域のプロモータ分析によって、脂肪細胞特異的な発現を誘導するC/EBP転写因子が特定された(Schaffler, A. et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1399, 187-197 (1998)., Saito, K. et al., *Biol. Pharm. Bull.* 22, 1158-1162 (1999).)。しかし、肥満症で観察される肥大脂肪細胞におけるアディポネクチン発現低下を決定づける上流因子がどこにあるかは、同定されていない。興味深いことに、ルシフェラーゼ遺伝子に連結させたアディポネクチンプロモータ領域の-1367から+35までを含む領域のプロモータ活性は、前駆脂肪細胞(第0日)又は大型脂肪細胞(第19日)と比較して、小型の脂肪細胞(第10日)の方が高く(図2a)、それはアディポネクチンの発現レベルと相関した。

アディポネクチン発現を低下させることが示されているTNF α は肥大脂肪細胞で増加する。そのため、TNF α が肥大脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現を低下させる原因因子であるとの予測は合理的である(Barth, N. et al., *Diabetologia* 45, 1425-1433 (2002).)。

小型脂肪細胞(第10日)をTNF α とともにインキュベーションすることは、実際に、アディポネクチン遺伝子のプロモータ活性を低下させた(図2b)。しかし、TNF α を抗体により中和した場合の効果は、肥大脂肪細胞(第19日)で低下したアディポネクチン遺伝子のプロモータ活性に対して何ら影響を与えなかった(図2c)。これらデータは、肥大脂肪細胞におけるアディポネクチン発現の低下の原因となるシグナル伝達経路として、TNF α 以外が存在し得ることを示唆した。

[0059] [実施例3] 肥大脂肪細胞は、近位32bpプロモータエレメントを通じてアディポネクチンプロモータを調節している

肥大脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子の不応答性に関与するプロモータ

領域を特定するために、ファンクショナル5'ディリーション解析を実施した。これまでの研究で-1367から-217領域の欠損は、第19日目の3T3L1脂肪細胞におけるアディポネクチンプロモータ活性に対して実質的に影響しないことが明らかにされた(図3a)。対照的に、第19日目の3T3L1脂肪細胞において、さらに90ヌクレオチドを欠質させると、アディポネクチンプロモータ活性が回復した。このことから-217/-127に必須の調節エレメントが含まれることが示唆された。

転写因子が結合するエレメントを同定するために、EMSAを用いて、ファンクショナル5'ディリーション解析を更に実施した。EMSAを用いた-217/-127プロモータ領域の解析において、第19日の3T3L1脂肪細胞よりも第10日目の3T3L1脂肪細胞で一つの主要な複合体がこのエレメントに多く結合することが示された(図3b)。-217から-189領域の欠失は、第10日目の3T3L1脂肪細胞由来の核抽出物中の結合タンパク質の量に実質的に影響しなかった(図3b)。対照的に、さらに32ヌクレオチドを欠質させると、第10日目の3T3L1脂肪細胞内での結合タンパク質の量を顕著に減少させ(図3b)、-188/-157が必須結合エレメントを含むことを示唆した。重要なことに、32bpのエレメント(-188/-157)に結合した主要複合体は、痩せた対照のC57B6マウスおよび第10日の3T3L1脂肪細胞よりも、肥満モデルであるob/obマウスおよび第19日目の3T3L1脂肪細胞では少なかった(図3c)。

このプロモータ領域のエンハンサー特性を詳細に調べるために、このエレメントをプロモータ系に組み込み、機能解析を行った(図3d)。この-188/-157エレメントの存在は、第10日目の3T3L1脂肪細胞では、対照であるpGL-2-tk-Lucベクターのみと比較して基底転写活性を5倍上昇させたが、第19日目の細胞では同様の上昇は観察されなかった(図3d)。

[0060] [実施例4] 32bpエレメント結合タンパク質の酵母one-hybridクローニング

肥大脂肪細胞においてアディポネクチン遺伝子プロモータの下方調節しているトランス因子を単離するために、酵母one-hybridクローニングアプローチを用いた(Almoguera, C. et al., J. Biol. Chem. 277, 43866-43872 (2002).)。32bpをバイトとして用いた。この配列を三量体化してHIS3レポーター遺伝子の上流に組み込み、酵母細胞に導入して(32bp)x3::HIS3レポーター酵母株を作成した。

22の陽性コロニーを得た。これらクローンは、異なる群が含まれていた。ヌクレオチド及び推定アミノ酸の配列から、二つの群に分けられた。一つの群は、10個の独立したcDNA単離体と2個の独立したcDNA単離体とでそれぞれ、クルップル様転写因子(KLF)ファミリー(Shindo, T. et al., Nat. Med. 8, 856-863 (2002).、Morita, M. et al., Mol. Cell. Biol. 23, 2489-2500 (2003).) 3及び9に属する転写因子をコードしていた。他の一群は、4個の独立したcDNA単離体によるもので、転写因子であるNF- κ Bp65(Suzawa, M. et al., Nat. Cell Biol. 5, 224-230 (2003).)をコードしている。

[0061] [実施例5] EMSAにより、32bpの結合複合体は、KLF9を含むことがin vitro及びin vivoで明らかにされた

32bpに結合する核内因子を更に特定するために、KLF3、KLF9又はNF- κ Bp65を認識する特異的な抗体を用いて、EMSA超シフト実験を実施した。これらの研究で、3T3L1脂肪細胞(第10日)内で複合体Iが、KLF9タンパク質を含むことが特定された(図4a右、レーン1及び2)。対照的に、KLF3(図4b)はもとよりNF- κ Bp65(図4a右、レーン1及び3)も、in vitroでは小型脂肪細胞内では検出されなかった。対照EMSAでは、293T細胞の核抽出物をプローブである標識KLF9コンセンサス部位とともに用いることにより、KLF9抗体の特異性が確認された(図4c)。KLF3抗体(図4b左)又はNF- κ Bp65抗体(図4a左)の機能は、コグネイトタンパク質である核抽出物を発現する293Tを、それぞれ、放射性標識プローブとしてKLF3コンセンサス部位又はNF- κ Bコンセンサス部位(p65部位)とともに用いたスーパーシフトアッセイにより確認された。重要なことに、KLF9抗体は32bp結合タンパク質の量を減少させ(図4d)、in vivoでも32bp結合タンパク質(複合体)にKLF9が含まれることを示唆した。

これらの結果を確認するために、EMSA競合解析を実施した。複合体Iは、過剰量のKLF共通配列であるBTEによって完全に競合阻害されることが見出された。(データ示されず)。対照的に、NF- κ B共通配列は、明らかに、効果的ではなかった(データ示されず)。

これらの知見を更に確認するために、染色対免疫沈降アッセイを実施した。KLF9は、実際に、32bp部位を含む内在性アディポネクチンプロモータ領域に結合するこ

とが見出された(図4e)。さらに、精製したKLF9によっても、脂肪細胞又は脂肪組織から調製した核抽出物による32bpフラグメントの阻害とほぼ同じ阻害が見られた(図4f)。

- [0062] [実施例6] KLF9の発現は脂肪細胞の分化に従い増大し、一方、脂肪細胞の肥大に従い低下した

次に、脂肪細胞の分化の過程、及び脂肪細胞の肥大化の過程におけるKLF3及び9の発現を調べた。KLF9の発現は、脂肪細胞の分化の過程で増大したが、脂肪細胞の肥大の過程では逆に低下した(図5a、下)。対照的に、KLF3の発現レベルは、脂肪細胞の分化と肥大との双方の過程で低下した(図5a、上)。さらに、KLF9のmRNAレベル(図5a)及びタンパク質レベル(図5b)は肥満したob/obマウスよりも、痩せた対照C57BL6マウスで高かった。この結果は32bp結合タンパク質の量と相関すると予想され、KLF9の発現レベルがアディポネクチンのプロモータ活性、及びアディポネクチンの発現レベルを調節し得るという可能性が強く示唆された。

- [0063] [実施例7] KLF9の発現は、エンハンサー及びアディポネクチンプロモータ活性、32bp結合タンパク質の量、並びにアディポネクチン発現を増大させた

3T3L1脂肪細胞(第19日)(図6a～c)又はレトロウイルスを用いて3T3L1脂肪細胞(第19日)内で(図6d～f)、KLF9を一過的に過剰発現させ、エンハンサー活性、アディポネクチンプロモータ活性、32bp結合タンパク質量、およびアディポネクチン発現量を解析した(図6)。3T3L1脂肪細胞(第19日)でのKLF9の過剰発現は、アディポネクチンプロモータ活性(−1367/+35)(図6a)、32bp(−188/−157)エンハンサー活性(図6c右パネル)及び32bp結合タンパク質の量(図6e)を増大させた。KLF9は、アディポネクチンプロモータ活性を増大し得ること(図6a)及び32bpエレメントがKLF9に高い反応性を有すること(図6c、e)を立証した。

さらに、3T3L1脂肪細胞内でのレトロウイルスによるKLF9の定常的な過剰発現(図6d)は、アディポネクチン発現を増大させた(図6f)。これらのデータは、3T3L1脂肪細胞(第19日)におけるKLF9の過剰発現が、32bp結合タンパク質の量、32bpエンハンサー活性、アディポネクチンプロモータ活性及びアディポネクチン発現を3T3L1脂肪細胞(第10日)で観察されたレベルまで回復できることを示唆した。

- [0064] [実施例8] siRNAによるKLF9発現の抑制は、32bp結合タンパク質の量及びアディポネクチン発現をin vitroで低下させた

次に、アディポネクチン発現に対するKLF9の機能的重要性を調べるために、KLF9発現を低下させた際の効果を検討した。KLF9発現抑制の手法として、siRNA (Miyagishi, M. & Taira, K. Nat. Biotechnol. 20, 497-500 (2002).)を用いた。siRNAによるKLF9発現の抑制(図7a)は、KLF3発現には大きな影響はなかった(図7a)。一方、32bp結合タンパク質の発現レベルは、KLF9発現抑制により、顕著に低下し(7b)、これと同時に、3T3L1脂肪細胞(第10日)におけるアディポネクチン発現を大幅に低下させた(図7a)。これらのデータは、KLF9が32bpエンハンサー結合タンパク質複合体の形成及びアディポネクチン発現に必要であることを示す。

- [0065] [実施例9] 遺伝子ターゲティングによるKLF9発現の破壊は、32bp結合タンパク質の量及び血漿アディポネクチンレベルをin vivoで低下させた

次に、in vivoでのアディポネクチン発現とKLF9との機能的関連性を調べるために、KLF9ノックアウトマウスの表現型を解析した(図8a) (Morita, M. et al., Mol. Cell. Biol. 23, 2489-2500 (2003).)。興味深いことに、32bp結合タンパク質は、KLF9ノックアウトマウス「WAT」由来の核抽出物中には検出されなかった(図8b)。重要なことに、KLF9ノックアウトマウスの体重は対照の野生型同腹仔よりも少なかったにもかかわらず、KLF9ノックアウトマウスの血漿アディポネクチンレベルは対照の野生型同腹仔よりも低かった(図c)。対照的に、KLF3ノックアウトマウスとその対照の野生型同腹仔との間では、血漿アディポネクチンレベルの差は無かった(データ示されず)。これらのデータは、KLF9がin vivoでアディポネクチンレベルの調節に重要な役割を果たすことを示唆した。

- [0066] [実施例10] 脂肪細胞の肥大化が脂肪細胞におけるKLF9発現を調節する機序

次に、脂肪細胞の肥大化が脂肪細胞におけるKLF9発現を調節する機序であるか否かを解析した。KLF9発現は、エネルギー消費に関与することが知られている甲状腺ホルモンにより誘導されると報告されている (Morita, M. et al., Mol. Cell. Biol. 23, 2489-2500 (2003).)。そのため、先ず甲状腺ホルモンレセプター α の発現をin vitro及びin vivoで調べた。興味深いことに、甲状腺ホルモンレセプター α の発現レベル

は、3T3L1大型脂肪細胞(第19日)又は肥満モデルob/obマウスでは、それぞれ、3T3L1小型脂肪細胞(第10日)又は痩せた対照のC57BL6マウスと比較すると低下していた(図9a、b)。その上、甲状腺ホルモンと3T3L1脂肪細胞(第19日)とのインキュベーションは、KLF9発現を増大させた(図9c)。

KLF9プロモータがAP-1部位を含むと報告されている(Chen, A. et al., Mol. Cell. Biol. 20, 2818-2826 (2000).)ことから、酸化ストレスが脂肪細胞肥大によるKLF9の発現制御に関与し得るとの仮説を立てた。興味深いことに、c-junN末端キナーゼ(JNK)/ストレス活性化タンパク質キナーゼ(SAPK)のインヒビターは、また抗酸化性N-アセチルシステイン(NAC)とともに、KLF9(図9d)と同時にアディポネクチン(9e)の発現を増大させた。これらの発現増大には甲状腺ホルモンレセプター α の関与はなかった(データ示されず)。これらのデータは、KLF9発現を増大させる上流の機序が、少なくとも部分的には、二つの経路(一方は、甲状腺ホルモンレセプター(TR) α シグナル伝達経路であり、他方は、TR α の発現とは無関係であるが、酸化ストレスに依存する)からなる可能性があることが示唆された。

- [0067] 上記仮説をさらに確認するために、脂肪細胞の肥大化過程における酸化ストレスの推移を測定した。3T3-L1細胞(第10日目および第18日目)から抽出したゲノムDNAを分解し、ゲノムDNA分解産物中に存在する8-OHdG(dGの酸化型)の量を特異抗体によるELISAによって測定した。8-OHdGの量は分化に伴い増加していた(図10)。肥大化に伴う8-OHdGの増加の原因を解析するために、脂肪細胞肥大化に伴う抗酸化活性の推移を調べた。抗酸化活性は、3T3-L1細胞(第10日目および第18日目)の融解物中における、メチオグロブリンによるABITのラジカル化を防ぐ活性として検出した。脂肪細胞の肥大化に伴い抗酸化活性が低下することが示された(図11)。

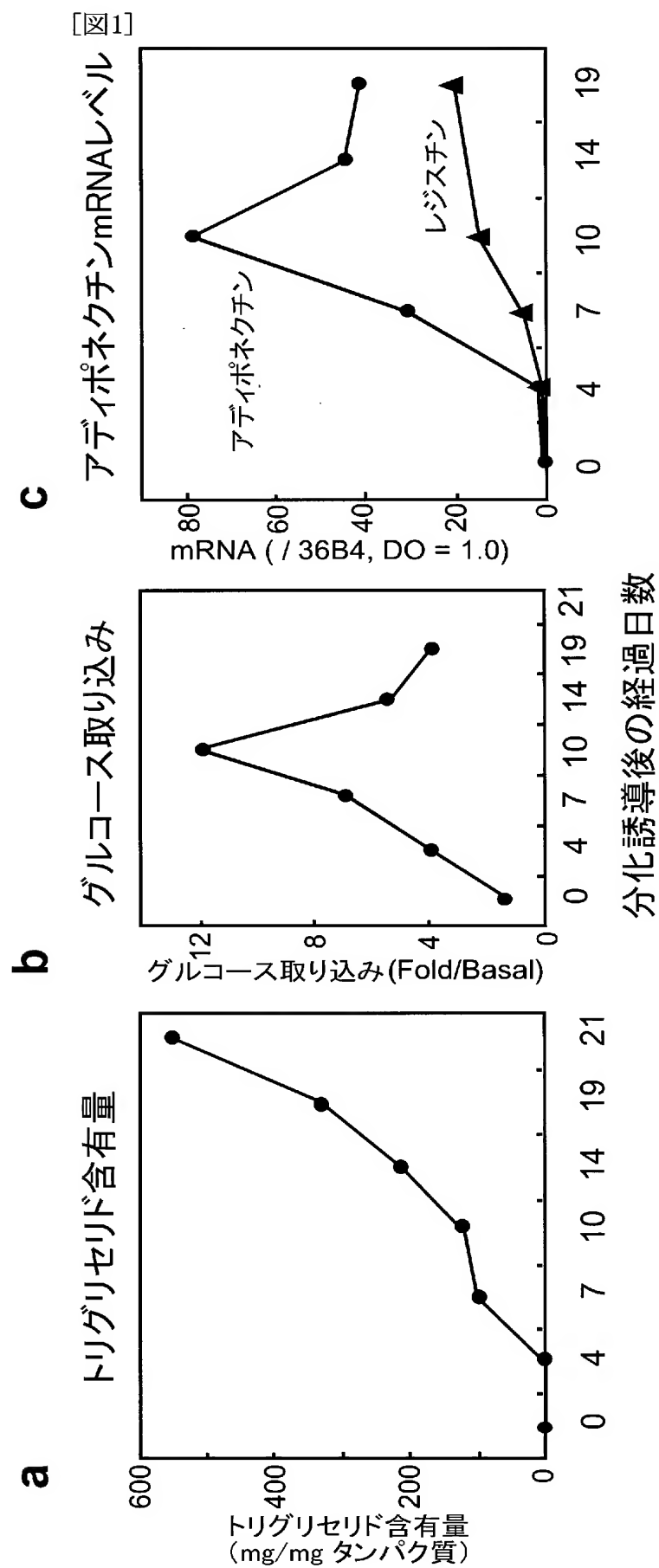
産業上の利用可能性

- [0068] KLF9の分子的特定は、肥満症及び糖尿病やアテローム性硬化症のような肥満症関連疾患におけるアディポネクチン/Acrp30の下向調節の分子の機序の理解と、KLF9を分子の標的とする新規な抗糖尿病及び抗アテローム性硬化症薬の設計を促進するはずである。

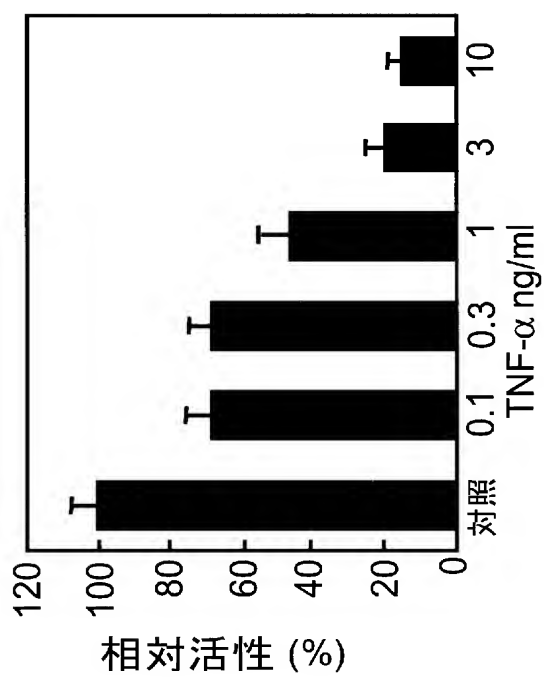
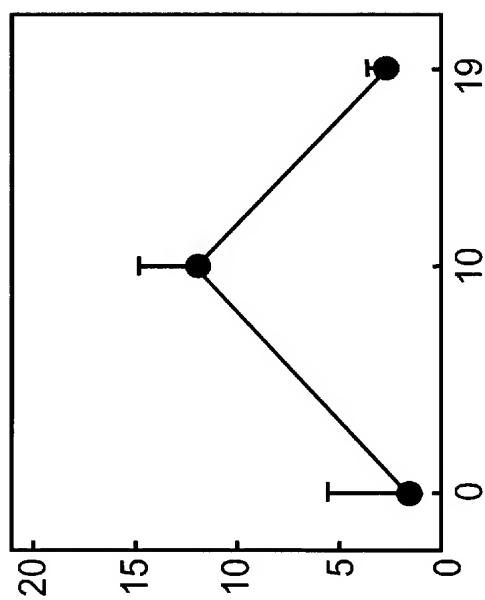
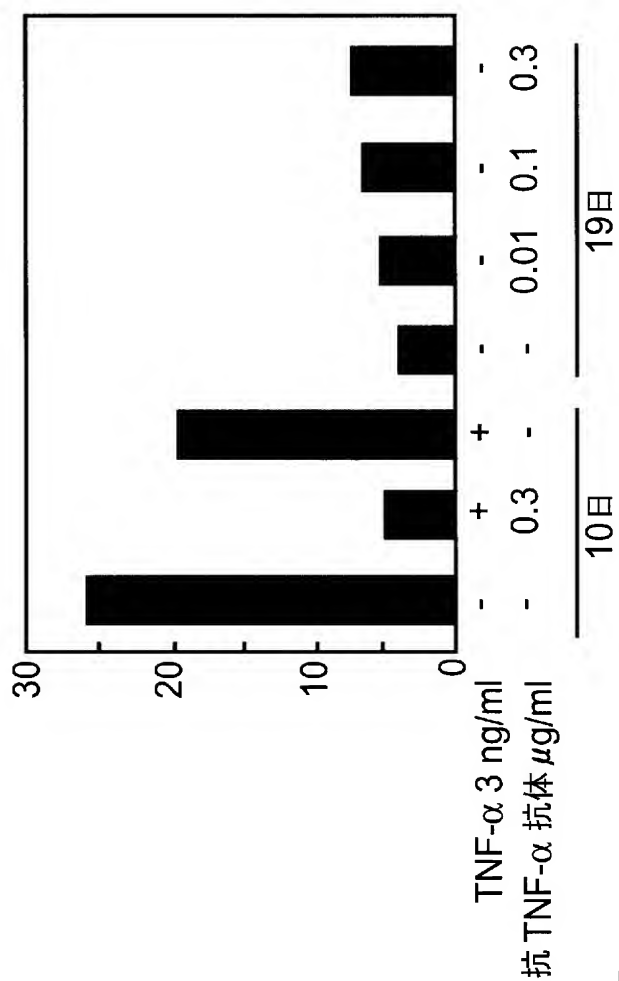
請求の範囲

- [1] 下記(1)または(2)記載のタンパク質を含有する、アディポネクチン発現誘導剤。
(1)配列番号:2記載のアミノ酸配列からなるタンパク質
(2)配列番号:2記載のアミノ酸配列において、一以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入を有するアミノ酸配列からなるタンパク質
- [2] 下記(1)または(2)記載のDNAまたは該DNAを保持したベクターを含有する、アディポネクチン発現誘導剤。
(a)配列番号:1記載の塩基配列を有するDNA
(b)配列番号:1記載の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。
- [3] 請求項1または2に記載のアディポネクチン発現誘導剤を有効成分とする、代謝性疾患または心疾患の予防・治療用医薬組成物。
- [4] 下記(1)または(2)からなるエンハンサーエレメントを少なくとも備えたレポーター遺伝子を保持した、アディポネクチン発現誘導物質のスクリーニング用細胞。
(1)配列番号:5記載の塩基配列からなるDNA
(2)配列番号:5記載の塩基配列において、1塩基以上の欠失、付加、置換または挿入を有する塩基配列からなるDNA
- [5] さらにKLF9をコードしたDNAを保持した、請求項4記載の細胞。
- [6] 脂肪細胞である、請求項4または5記載の細胞。
- [7] 肥大脂肪細胞である、請求項4または5記載の細胞。
- [8] 下記(1)から(3)の工程を含む、アディポネクチン発現誘導物質のスクリーニング方法。
(1)請求項4記載の細胞に被検物質を作用させる工程
(2)レポーター遺伝子の発現を検出する工程
(3)被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程
- [9] 下記(1)から(3)の工程を含む、アディポネクチンの発現の誘導をし得る物質のスクリーニング方法。
(1)請求項5記載の細胞に被検物質を作用させる工程

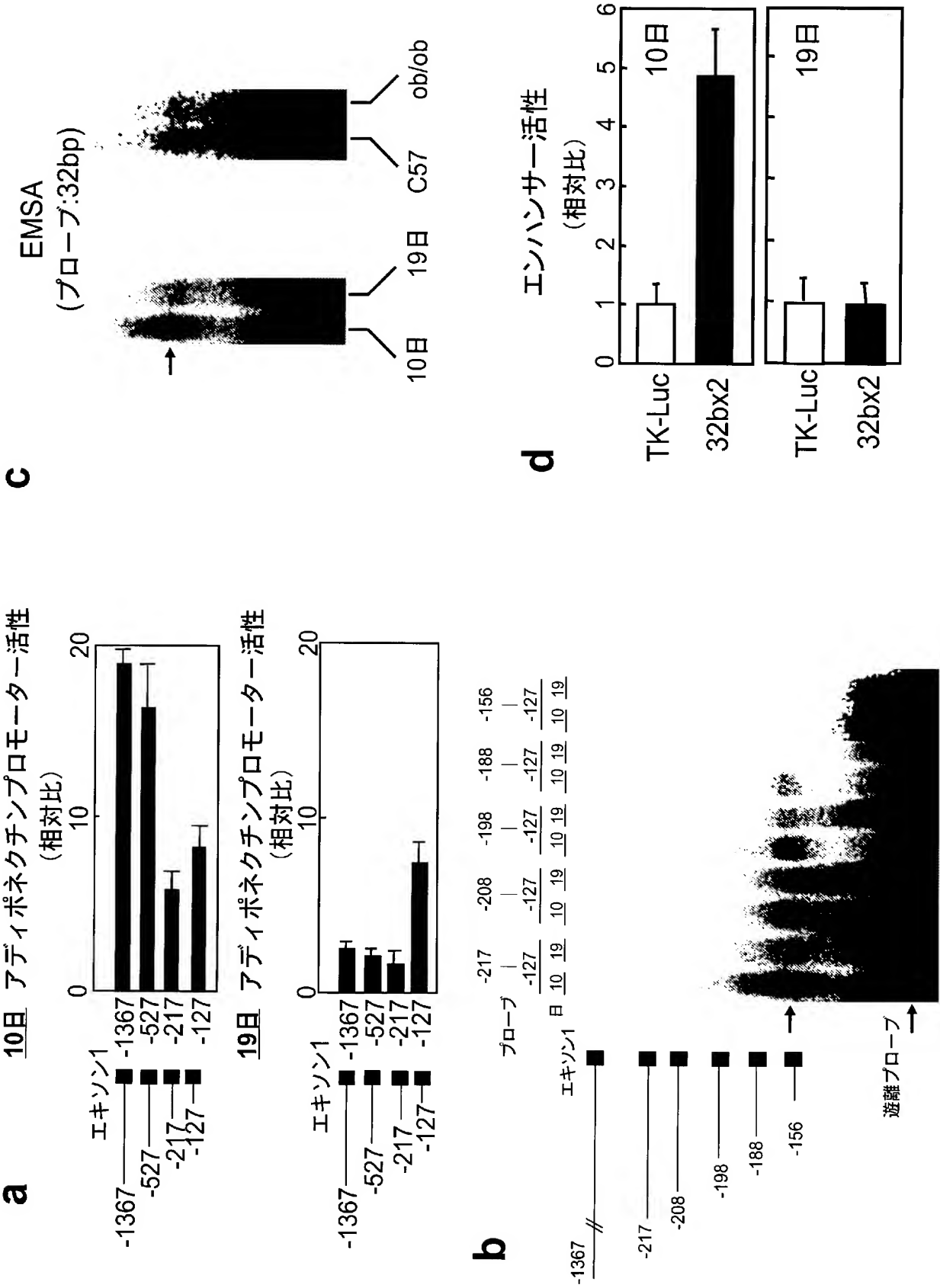
- (2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程
 - (3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程
- [10] 下記(1)から(3)の工程を含む、肥満症またはこれに関連する疾患の予防・治療用薬剤のスクリーニング方法。
- (1) 請求項4記載の細胞に被検物質を作用させる工程
 - (2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程
 - (3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程
- [11] 下記(1)から(3)の工程を含む、肥満症またはこれに関連する疾患の予防・治療用薬剤のスクリーニング方法。
- (1) 請求項5記載の細胞に被検物質を作用させる工程
 - (2) レポーター遺伝子の発現を検出する工程
 - (3) 被検物質を作用させた場合のレポーター遺伝子の発現が、被検物質非作用の場合のレポーター遺伝子の発現より高い被検物質を選択する工程



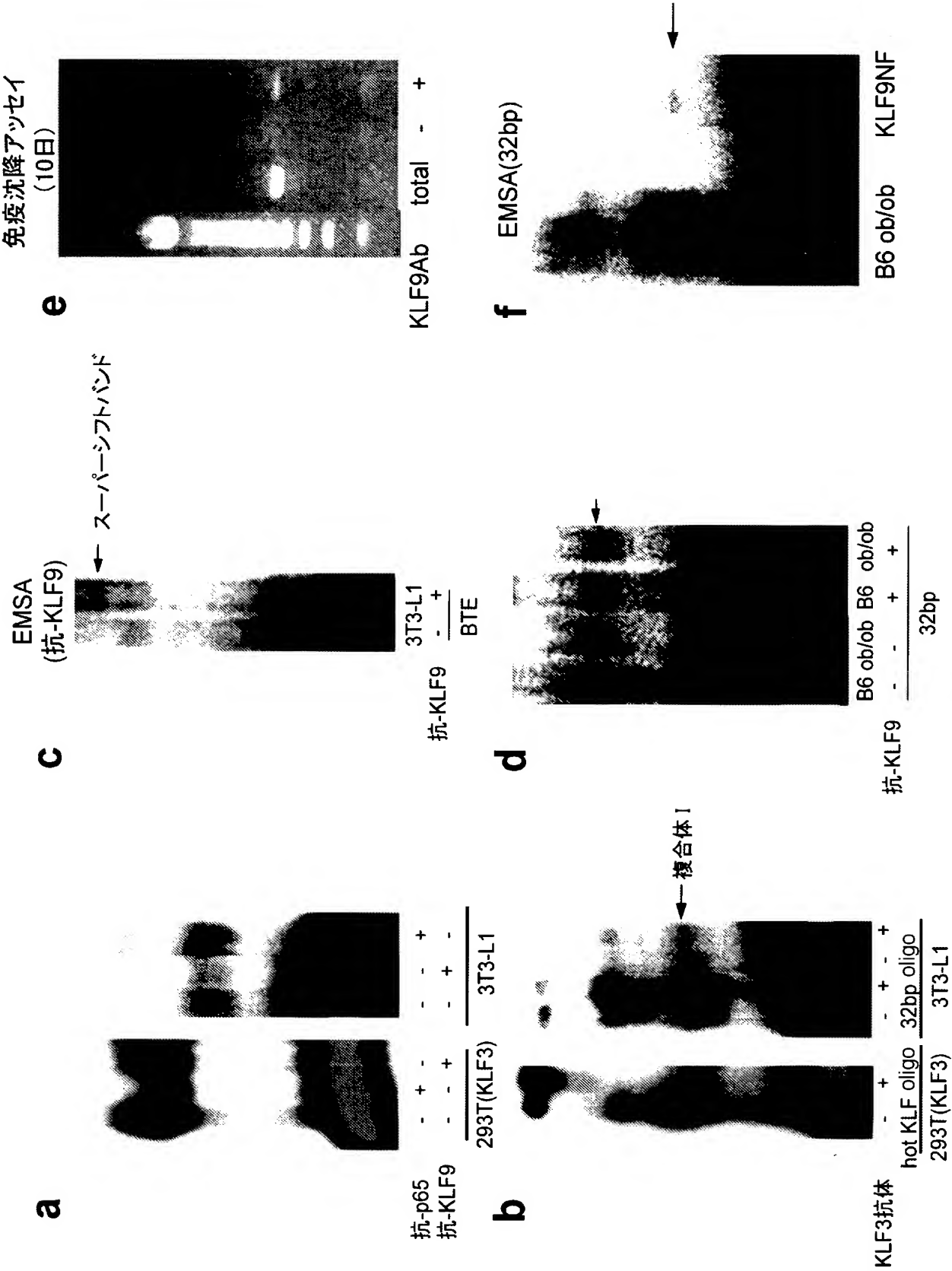
[図2]



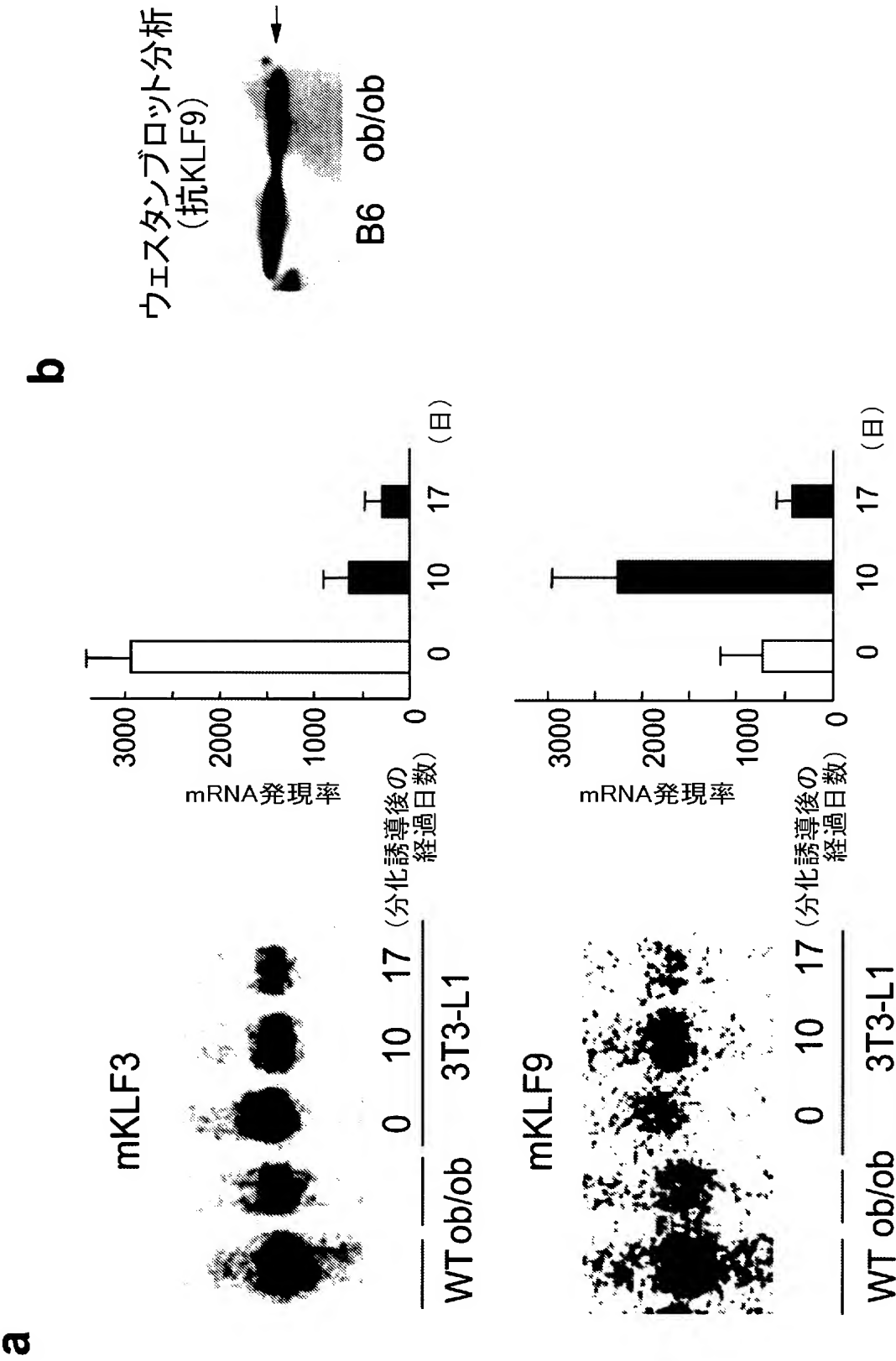
[図3]



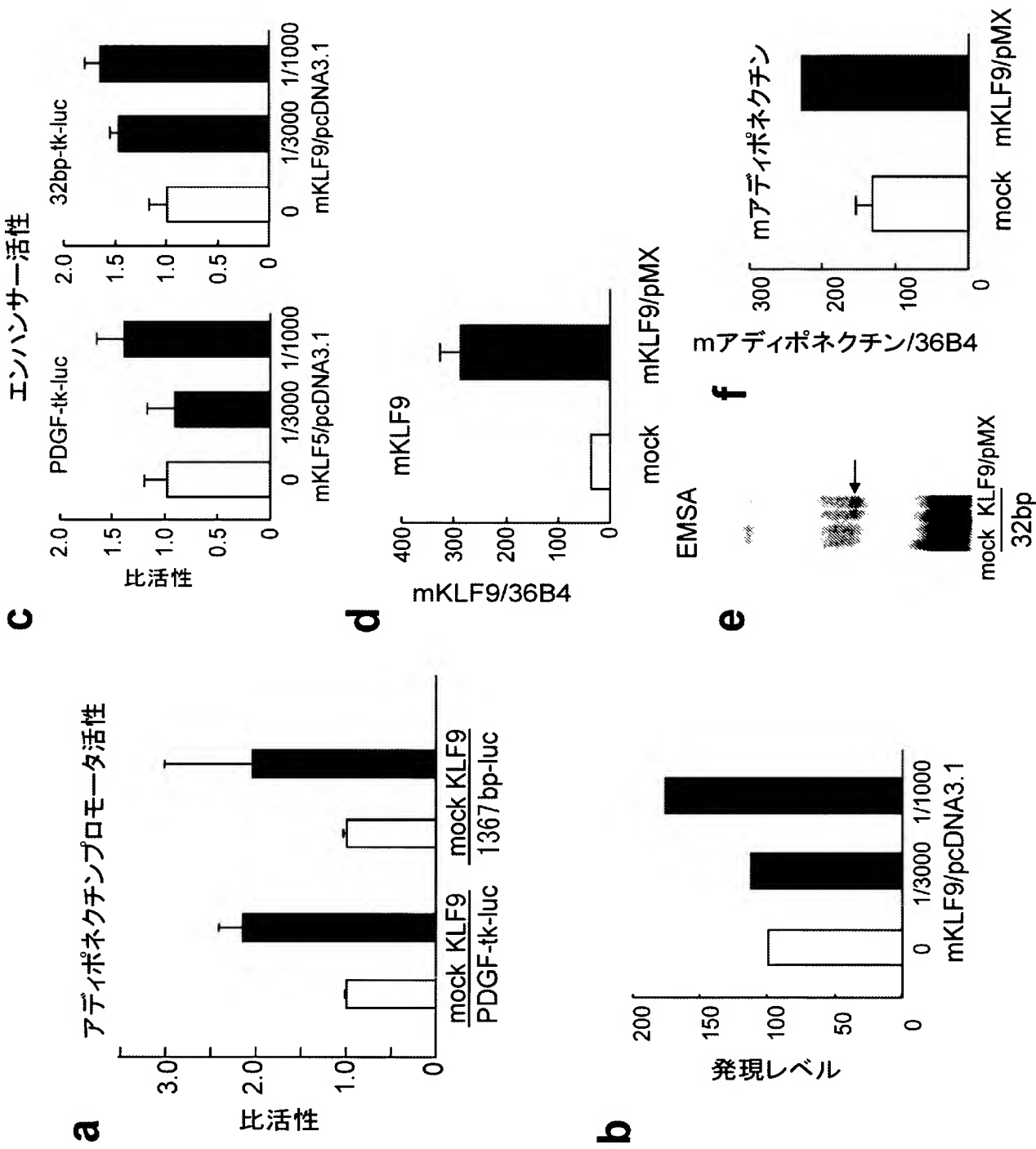
[図4]



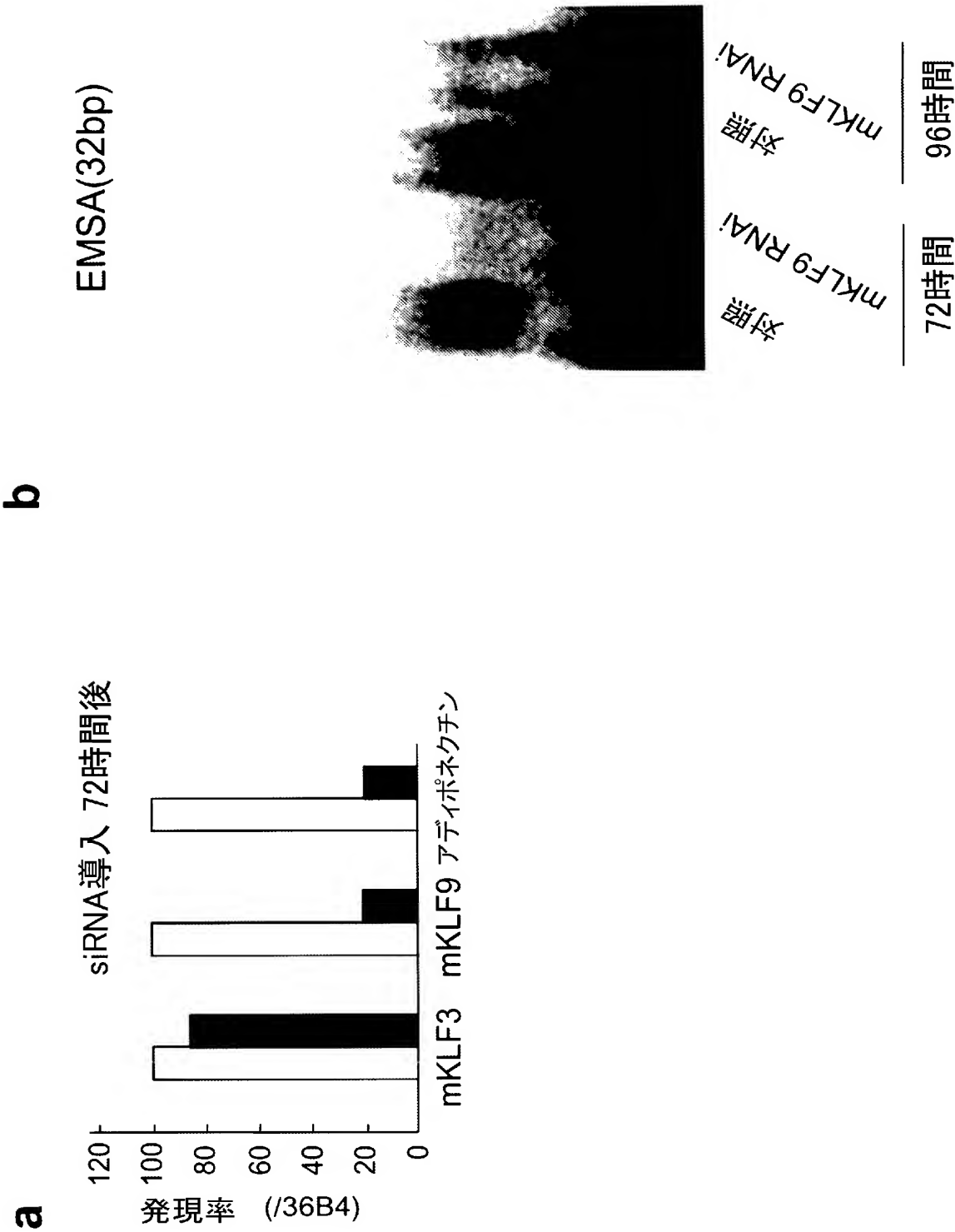
[図5]



[図6]



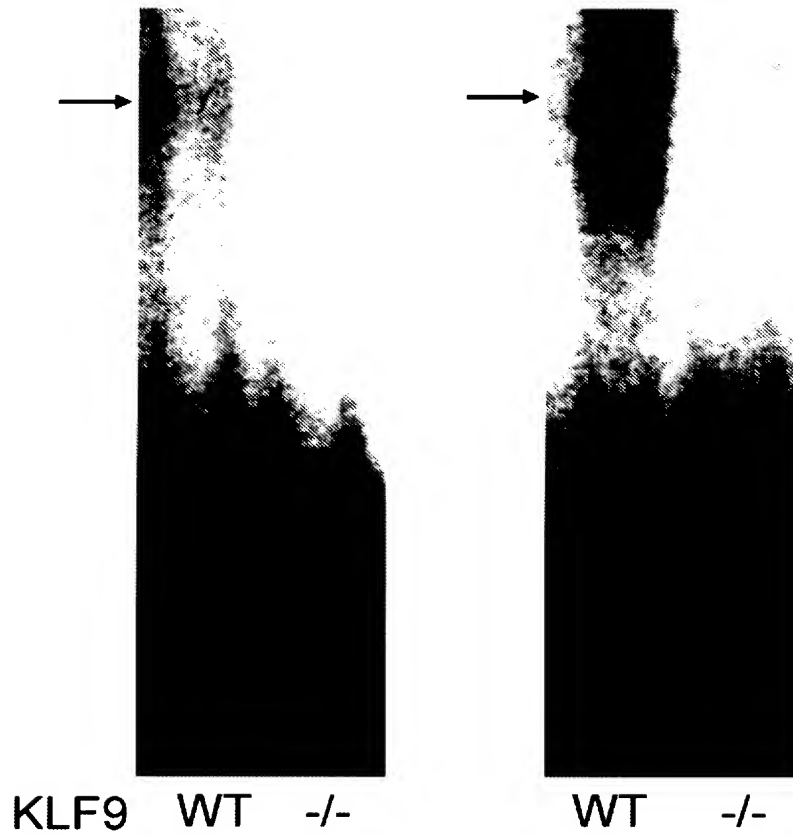
[図7]



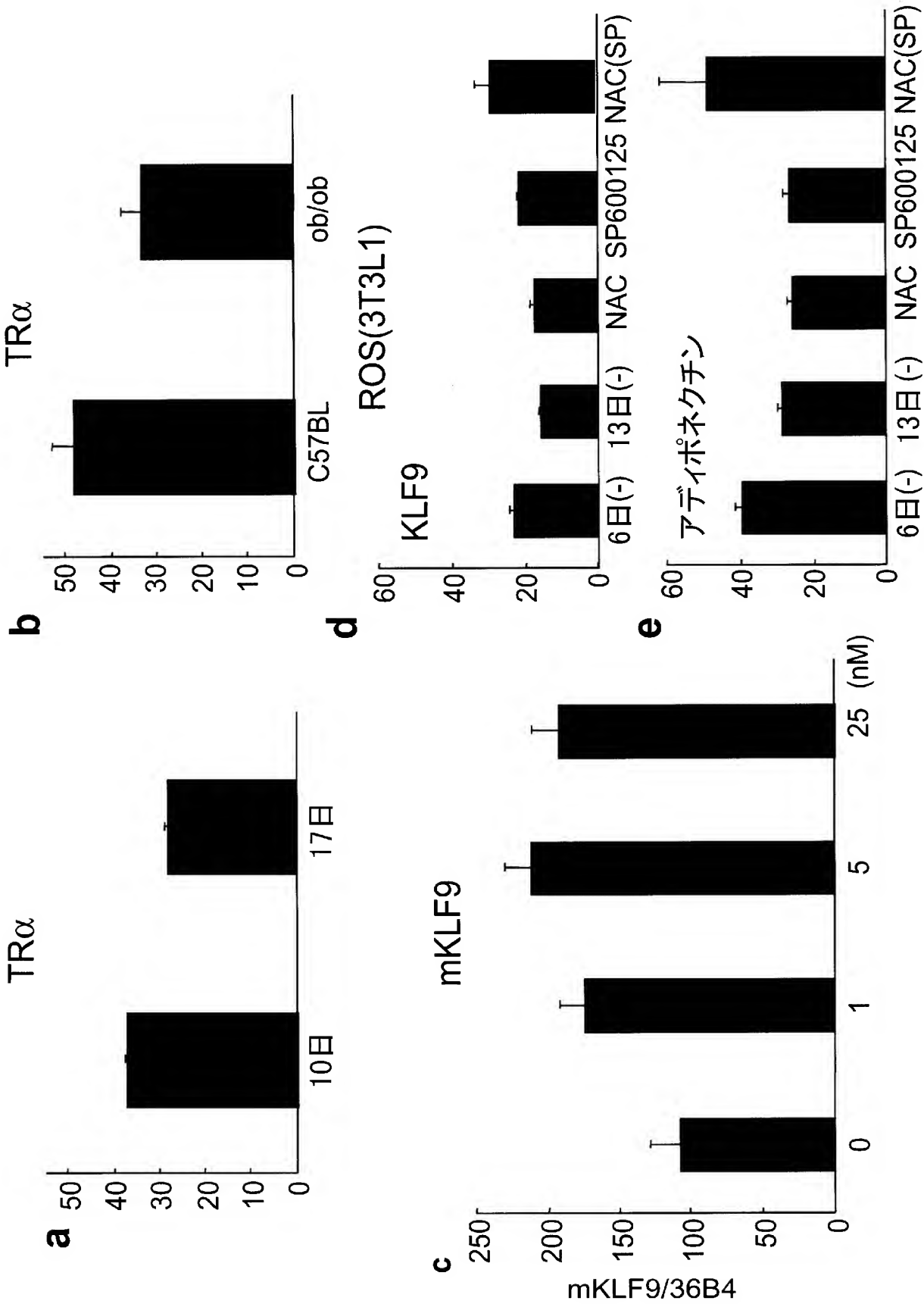
[図8]

EMSA

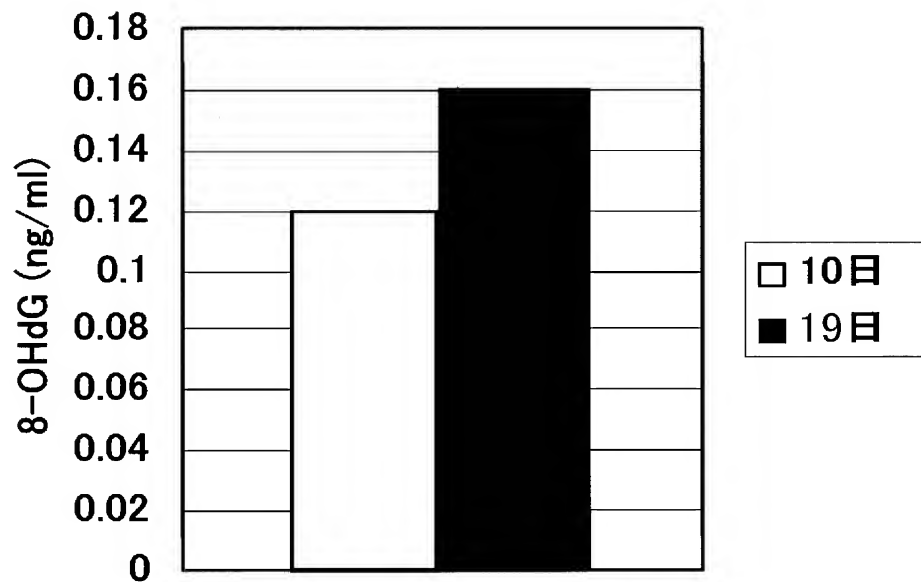
KLF9コンセンサスプローブ 32bpプローブ



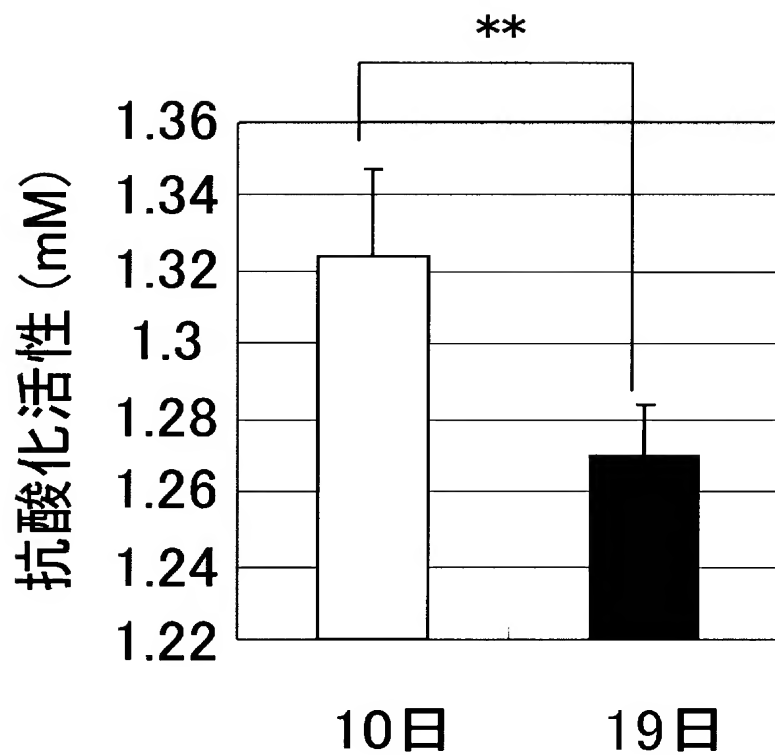
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P3/00, 3/04, 3/10, 9/00, C12N5/10,
C12Q1/02, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/00-38/58, 45/00-45/08, 48/00, A61P1/00-43/00,
C12N5/00-5/10, C12Q1/00-1/02, G01N33/00-33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAPLUS (STN),
WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FREUBIS, J. et al., Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2001, 98(4), pages 2005 to 2010	1-11
A	DAS, K. et al., Chromosomal Localization Expressio Pattern, and Promotpr Analysis of the Mouse Gene Encoding Adipocyte-Specific Secretory Protein Acrp30., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, 280, pages 1120 to 1129	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April, 2005 (19.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IMHOF, A., et al., Transcriptional Regulation of the AP-2 α Promotor by BTEB-1 and AP-2rep, a Novel wt-1/egr-Related Zinc Finger Repressor.Mol.Cell.Biol., 1999, 19(1), pages 194 to 204	1-11
P,X P,A	WO 2004/058970 A1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), & AU 2003292822 A1	4,6-8,10 1-3,5,9,11
P,A	WO 2004/078741 A1 (San-Ei Gen F.F.I., Inc.), 16 September, 2004 (16.09.04), (Family: none)	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006357

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/00, 45/00, 48/00, A61P3/00, 3/04, 3/10, 9/00, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/00-38/58, 45/00-45/08, 48/00, A61P1/00-43/00, C12N5/00-5/10, C12Q1/00-1/02, G01N33/00-33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAlus (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FREUBIS, J., <i>et al.</i> , Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2001, 98(4), pp.2005-2010	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

9736

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DAS, K., <i>et al.</i> , Chromosomal Localization, Expression Pattern, and Promotpr Analysis of the Mouse Gene Encoding Adipocyte-Specific Secretory Protein Acrp30. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, 280, pp.1120-1129	1 - 1 1
A	IMHOF, A., <i>et al.</i> , Transcriptional Regulation of the AP-2 α Promotor by BTEB-1 and AP-2rep, a Novel wt-1/egr-Related Zinc Finger Repressor. Mol. Cell. Biol., 1999, 19(1), pp.194-204	1 - 1 1
P X P A	WO 2004/058970 A1(小野薬品工業株式会社) 2004. 07. 15, & AU 2003292822 A1	4, 6-8, 10 1-3, 5, 9, 11
P A	WO 2004/078741 A1(三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) 2004. 09. 16 (ファミリーなし)	1 - 1 1